



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO OBSERVACIONAL TRANSVERSAL DE PARASITAS EM CÃES ERRANTES NO  
CONCELHO DE VILA FRANCA DE XIRA, PORTUGAL

JOÃO PEDRO GIBERT ALVAREZ BETTENCOURT DOS SANTOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADOR

Mestre Hugo Abel Sampaio  
Monteiro Martins Pissarra

2014

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO OBSERVACIONAL TRANSVERSAL DE PARASITAS EM CÃES ERRANTES NO  
CONCELHO DE VILA FRANCA DE XIRA, PORTUGAL

JOÃO PEDRO GIBERT ALVAREZ BETTENCOURT DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira de da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADOR

Mestre Hugo Abel Sampaio  
Monteiro Martins Pissarra

2014

LISBOA

**" A grandeza de uma nação e o seu progresso moral podem ser avaliados  
pela forma como são tratados os seus animais."**

**Mahatma Gandhi**

## Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca Sampaio, por ter aceite o meu pedido de orientação e por me ter dirigido durante todo o trabalho efectuado no âmbito desta dissertação, assim como por toda a dedicação, disponibilização e apoio no seu desenvolvimento e por toda a amizade.

Ao Mestre Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra, por ter aceitado ser meu co-orientador e pela disponibilidade e apoio concedidos na execução da dissertação do mestrado e por toda a amizade.

À Professora Doutora Yolanda Vaz, pela sua disponibilidade e esclarecimento de dúvidas relativas à análise de dados e apresentação de resultados.

Ao Engenheiro António Carlos Vitória por todo o seu apoio e amizade e por tornar fácil a resolução de variados problemas quotidianos.

À Merial, na pessoa da Dr<sup>a</sup> Ana Leal, por toda a sua disponibilidade em colaborar na execução deste estudo e ainda pelo financiamento dos *kits* para pesquisa de anticorpos anti-hemoparasitas.

Ao Projecto FCT PTDC/CUT/118566/2010, pela cedência de *Kits Leishmania* Spot IFI.

À Dr<sup>a</sup> Lúcia Gomes, pelas orientações laboratoriais e por me ter aturado durante muitos meses sempre com óptima disposição.

À Sofia Carmo pelo seu contributo na execução da técnica de Baermann e pela sua boa disposição.

À Dr<sup>a</sup> Cátia Marques pelo seu auxílio na identificação de ixodídeos e pela simpatia e prontidão em ajudar.

Aos meus pais, por tudo o que me ensinaram toda a minha vida e pelo seu amor.

À minha filha, Diana Alvarez, pela enorme importância e amor que tem na minha vida.

A todos os meus amigos, que sempre me acompanharam, especialmente ao Emanuel Varela, ao Hugo Rocha, ao Juan Soutullo, ao Pedro Bargão e ao Pedro Mendonça, que estão presentes em todos os momentos da minha vida.

A ti Dalila, por tudo o que representas para mim e pelo teu apoio incondicional.

## RESUMO

### ESTUDO OBSERVACIONAL TRANSVERSAL DE PARASITAS EM CÃES ERRANTES NO CONCELHO DE VILA FRANCA DE XIRA, PORTUGAL

Os animais errantes são uma população particularmente importante em medicina veterinária, permitindo a manutenção dos agentes no biótopo e a dispersão para áreas não endémicas. Esta população tem vindo a aumentar, por todo o mundo, sendo fácil o seu contacto, quer directo quer indirecto com o Homem.

Este trabalho foi elaborado com a intenção de pesquisar parasitas de vários órgãos, sistemas e localizações, na população de cães errantes do concelho de Vila Franca de Xira, Portugal, utilizando várias técnicas de diagnóstico.

Relativamente a parasitas do sistema macrofágico fagocítico e de células do sangue, este estudo detetou uma seroprevalência de 28,75% (23/80) de *Leishmania infantum*, 57,5% (46/80) de *Babesia canis/B. vogeli/B. rossi*, 34% (28/80) de *Anaplasma phagocytophilum*, 34% (29/80) de *Ehrlichia canis* e 76,2% (61/80) de *Rickettsia conorii*. No entanto, não foram detetados hemoparasitas através de esfregaços sanguíneos.

No que se refere a parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas, foi detetada, pelo teste *Speed Diro* uma prevalência de 12,2% (10/80) de *Dirofilaria immitis* e, por pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott, foram observadas prevalências de 10% de *D. immitis* (8/80) e 11,25% (9/80) de *Acanthocheilonema reconditum*. Pela técnica de Baermann não foram detetadas larvas de *Angiostrongylus vasorum*.

Os parasitas intestinais identificados pela técnica de Willis foram: *Toxocara canis* (15%), *Strongyloides stercoralis* (7,5%), *Ancylostoma caninum* (15%), *Uncinaria stenocephala* (16,25%), *Trichuris vulpis* (11,25%), *Taenia* spp. (10%). Pela técnica de Ziehl-Neelsen, foram observados quistos de *Giardia* spp. (32,5%) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (11,25%). Foram ainda, identificados proglotes de *Dipylidium caninum* nas fezes de 3,75% dos animais.

Relativamente a ectoparasitas, foram observados ácaros, ixodídeos e pulgas, sendo: 30% (6/20) de *Sarcoptes scabiei* e 10% (2/20) de *Demodex canis*, apenas em animais suspeitos e, 23,75% (19/80) de *Rhipicephalus sanguineus* e 10% (8/80) de *Ctenocephalides felis*. Não foram observados ácaros pelas técnicas de colheita de cerúmen auricular e escovagem do pêlo.

Foram ainda avaliadas co-infecções parasitárias e analisados diversos fatores que podem influenciar as prevalências obtidas para os diferentes agentes. A importância do estado sanitário da população canina errante no que se refere à Saúde Pública e à Saúde Animal foi salientada.

Palavras-chave: Cães errantes, Parasitas, CVBD, Helmintes, Protozoários, Ectoparasitas, Zoonoses, Saúde Pública, Vila Franca de Xira, Portugal.

## ABSTRACT

### CROSS-SECTIONAL STUDY OF PARASITES IN STRAY DOGS IN THE MUNICIPALITY OF VILA FRANCA DE XIRA, PORTUGAL

Stray animals are a population particularly important in veterinary medicine, enabling retention of agents in the biotope and dispersal to non-endemic areas. This population has been increasing throughout the world, with its easy contact, both directly and indirectly with the man.

This work was done with the goal of searching parasites in various organs, systems and locations in stray dog population from the municipality of Vila Franca de Xira, Portugal, using several diagnostic techniques.

For parasites of macrophage phagocytic system and blood cell the study detected seroprevalence of 28.75% (23/80) for *Leishmania infantum*, 57.5% (46/80) for *Babesia canis* / *B. vogeli* / *B.rossi*, 34% (28/80) for *Anaplasma phagocytophilum*, 34% (29/80) for *Ehrlichia canis* and 76.2% (61/80) for *Rickettsia conorii*. However, no hemoparasites were detected by blood smears.

With regard to parasites of the cardiovascular and respiratory systems, was detected at Speed Diro test, a 12.2% (10/80) prevalence of *Dirofilaria immitis* and by screening the Knott technique, a prevalence of 10% (8/80) microfilariae *D. immitis* were observed and 11.25% (9/80) *Acanthocheilonema reconditum* microfilariae. By Baermann technique, *Angiostrongylus vasorum* larvae were not detected.

Intestinal parasites identified by the technique of Willis were: *Toxocara canis* (15%), *Strongyloides stercoralis* (7.5%), *Ancylostoma caninum* (15%), *Uncinaria stenocephala* (16.25%), *Trichuris vulpis* (11.25%), *Taenia* spp. (10%). By Ziehl-Neelsen, cysts of *Giardia* spp. (32.5%) and *Cryptosporidium* spp. (11.25%) were observed. *Dipylidium caninum* proglottids were also identified in 3.75% of the animals feces.

For ectoparasites, mites, ticks and fleas were observed: 30% (6/20) of *Sarcoptes scabiei* and 10% (2/20) of *Demodex canis* only in susceptible animals and 23.75% (19/80) of *Rhipicephalus sanguineus* and 10% (8/80) of *Ctenocephalides felis*. No mites were observed by harvesting techniques of earwax and brushing.

Parasitic co-infections were further evaluated and various factors were analyzed that may influence the prevalence rates for different agents. The importance of canine population status regarding Human and Animal Health was emphasized.

Keywords: Stray dogs, Parasites, CVBD, Helminths, Protozoa, Ectoparasites, Zoonoses, Public Health Vila Franca de Xira, Portugal.

## Índice Geral

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
Índice Geral .....	v
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Gráficos .....	xiii
Lista de Abreviaturas .....	xiv
Capítulo I. Introdução .....	1
Capítulo II. Revisão bibliográfica .....	3
1. Parasitas de células do sangue e do sistema macrofágico fagocitário .....	3
1.1. Protozoários .....	3
1.1.1. <i>Leishmania infantum</i> .....	3
1.1.2. <i>Babesia canis</i> .....	7
1.1.3. <i>Hepatozoon canis</i> .....	10
1.2. Bactérias.....	11
1.1.4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	11
1.1.5. <i>Ehrlichia canis</i> .....	12
1.1.6. <i>Rickettsia conorii</i> .....	14
1.1.7. <i>Mycoplasma haemocanis</i> .....	15
2. Parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas .....	15
2.1. <i>Dirofilaria immitis</i> .....	16
2.2. <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	17
2.3. <i>Acanthocheilonema reconditum</i> .....	19
3. Parasitas do aparelho digestivo .....	19
3.1. Nemátodes.....	19
3.1.1. <i>Toxocara canis</i> .....	19
3.1.2. <i>Toxascaris leonina</i> .....	22
3.1.3. <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	22
3.1.4. <i>Ancylostoma caninum</i> .....	23
3.1.5. <i>Uncinaria stenocephala</i> .....	24
3.1.6. <i>Trichuris vulpis</i> .....	25
3.2. Céstodes.....	25
3.2.1. Família Taeniidae .....	25
3.2.2. <i>Dipylidium caninum</i> .....	26
3.3. Protozoários .....	27
3.3.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	27



3.3.2. <i>Giardia</i> spp. ....	28
4. Ectoparasitas .....	29
4.1. Ácaros.....	29
4.1.1. <i>Demodex canis</i> .....	30
4.1.2. <i>Sarcoptes scabiei</i> .....	31
4.1.3. <i>Octodectes cynotis</i> .....	31
4.1.4. <i>Cheyletiella yasguri</i> .....	32
4.2. Ixodídeos.....	33
4.2.1. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	34
4.2.2. <i>Dermacentor reticulatus</i> .....	35
4.2.3. <i>Ixodes ricinus</i> .....	35
4.2.4. Controlo de ixodídeos.....	35
4.3. Pulgas.....	35
4.3.1. <i>Ctenocephalides</i> .....	36
4.3.1.1. <i>Ctenocephalides canis</i> .....	36
4.3.1.2. <i>Ctenocephalides felis</i> .....	36
4.3.2. <i>Pulex irritans</i> .....	36
4.3.3. Controlo de pulgas.....	36

Capítulo III. Estudo observacional transversal em animais errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal.....	38
--	----

1. Objectivos.....	38
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Caracterização da área geográfica do estudo e da população.....	38
2.2. Clima.....	40
2.3. Caracterização do canil municipal.....	40
2.4. Constituição e caracterização da amostra populacional.....	41
2.5. Exame de estado geral.....	41
2.6. Colheita das amostras e processamento.....	41
2.6.1. Técnica de Imunofluorescência indirecta (IFI).....	43
2.6.2. Esfregaços de sangue com coloração Giemsa.....	43
2.6.3. Teste <i>Speed Diro</i> .....	43
2.6.4. Técnica de Knott Modificada.....	44
2.6.5. Técnica de Willis.....	44
2.6.6. Técnica de Ziehl-Neelsen.....	45
2.6.7. Técnica de Baermann.....	45
2.6.8. Raspagem cutânea.....	45
2.6.9. Colheita de cerúmen.....	45
2.6.10. Escovagem do pêlo.....	46
2.6.11. Colheita de ectoparasitas macroscópicos.....	46

2.7.	Análise estatística.....	46
3.	Resultados.....	46
3.1.	Caracterização da amostra populacional.....	46
3.2.	Clima.....	50
3.3.	Exame de estado geral.....	52
3.4.	Dados parasitológicos gerais.....	52
3.5.	Deteção de <i>L. infantum</i> por IFI.....	52
3.5.1.	Influência de fatores.....	54
3.6.	Deteção de hemoparasitas.....	56
3.6.1.	Deteção de hemoparasitas por esfregaço de sangue.....	56
3.6.2.	Deteção de anticorpos de hemoparasitas por IFI.....	56
3.6.3.	Co-infecções de hemoparasita.....	58
3.6.4.	Avaliação de fatores de influência.....	59
3.7.	Deteção de parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas.....	60
3.7.1.	Deteção de <i>D. immitis</i> pelo teste rápido <i>Speed Diro</i> .....	60
3.7.2.	Pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott modificado.....	61
3.7.3.	Co-infecções.....	62
3.7.4.	Influência de fatores na infecção por <i>D. immitis</i> .....	62
3.7.5.	Pesquisa de larvas de <i>A. vasorum</i> pela técnica de Baermann.....	63
3.8.	Pesquisa de parasitas intestinais.....	63
3.8.1.	Co-infecções parasitárias intestinais.....	66
3.8.2.	Influência de fatores.....	67
3.9.	Deteção de ectoparasitas.....	70
3.9.1.	Raspagem cutânea.....	70
3.9.2.	Colheita de cerúmen.....	71
3.9.3.	Escovagem do pêlo.....	71
3.9.4.	Colheita de ectoparasitas macroscópicos.....	71
3.9.4.1.	Influência e fatores.....	72
4.	Discussão.....	73
4.1.	Caracterização da amostra.....	73
4.2.	Clima.....	75
4.3.	Exame de estado geral.....	75
4.4.	Dados parasitológicos gerais.....	75
4.5.	Deteção de <i>L. infantum</i> por IFI.....	76
4.5.1.	Influência de fatores.....	78
4.6.	Deteção de hemoparasitas .....	79
4.6.1.	Deteção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo.....	79
4.6.2.	Deteção de hemoparasitas por IFI.....	80
4.6.3.	Co-infecções hemoparasitárias.....	83
4.6.4.	Influência de fatores.....	83

4.7. Detecção de parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas.....	84
4.7.1. Detecção de <i>D. immitis</i> pelo teste rápido <i>Speed Diro</i> .....	84
4.7.2. Pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott modificado.....	85
4.7.3. Co-infecções.....	86
4.7.4. Influência de fatores na infecção por <i>D. immitis</i> .....	86
4.7.5. Pesquisa de larvas de <i>A. vasorum</i> pela técnica de Baermann.....	87
4.8. Pesquisa de parasitas intestinais.....	87
4.8.1. Co-infecções parasitárias intestinais.....	91
4.8.2. Influência de fatores.....	92
4.9. Detecção de ectoparasitas.....	93
4.9.1. Raspagem cutânea.....	93
4.9.2. Colheita de cerúmen.....	94
4.9.3. Escovagem do pêlo.....	94
4.9.4. Colheita de ectoparasitas macroscópicos.....	94
4.9.4.1. Influência de fatores.....	96
5. Conclusão.....	97
6. Perspectivas e recomendações futuras .....	99
7. Bibliografia .....	101
ANEXOS .....	130

## Lista de Figuras

Figura 1: Mapa geográfico das freguesias do concelho de Vila Franca de Xira. ....	39
Figura 2: A) frente do canil municipal; B) acesso a jaulas de alojamento (individuais, coletivas e de sequestro) de cães; C) jaula hospitalar (originais). ....	40
Figura 3: Aspeto dos resultados de <i>L. infantum</i> obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais). ....	53
Figura 4: Sinais clínicos observados em animais da amostra, positivos a <i>L. infantum</i> - A) onicogribose; B) lesões muco-cutâneas ulcerativas nasais; C) Epistáxis; D) Alopecia exfoliativa no membro anterior direito; E) Evidente caquexia; F) Conjuntivite purulenta, blefarite e alopecia periocular exfoliativa; G) Dermatite exfoliativa com alopecia generalizada; H) Dermatite papular no tronco (originais).....	54
Figura 5: Aspeto dos resultados de <i>B. canis</i> obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais). ....	57
Figura 6: Aspeto dos resultados de <i>A. phagocytophilum</i> obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais). ....	57
Figura 7: Aspeto dos resultados de <i>E. canis</i> obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais). ....	57
Figura 8: Aspeto dos resultados de <i>R. conorii</i> obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais) .....	58
Figura 9: Fotografia de resultado positivo no teste rápido <i>Speed Diro</i> (original). ....	61
Figura 10: Microfilárias de <i>D. immitis</i> (A- técnica de Knott) e de <i>A. reconditum</i> (B- técnica de Knott); C – esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa (originais). ....	61
Figura 11: Ovos de parasitas intestinais, ampliação de 400 x: (A) <i>Toxocara canis</i> , (B) <i>Strongyloides stercoralis</i> ; (C) <i>Uncinaria stenocephala</i> ; (D) <i>Ancylostoma caninum</i> ; (E) <i>Trichuris vulpis</i> ; (F) <i>Taenia</i> spp. (originais). ....	64
Figura 12: Fotografias de parasitas adultos: (A) Aspecto de lábios de <i>Toxocara canis</i> ; (B) Aspecto de cauda de <i>Toxocara canis</i> (originais). ....	64
Figura 13: Fotografias (A) <i>Taenia</i> spp.; (B) Ovos de <i>Taenia</i> spp., após abertura de um segmento de parasita adulto e observação direta ao M.O; (C) proglote de <i>Dipylidium caninum</i> (originais).....	64
Figura 14: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp. (A) e quisto de <i>Giardia</i> sp. (B) em esfregaços de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (originais). ....	65
Figura 15: (A) <i>Sarcoptes scabiei</i> , após esclarecimento com lactofenol azul; (B) ovo de <i>Sarcoptes scabiei</i> , após esclarecimento com lactofenol azul; (C) <i>Demodex canis</i> , após esclarecimento com lactofenol azul (originais). ....	70
Figura 16: (A) <i>Rhipicephalus sanguineus</i> macho à esquerda e fêmea à direita; (B) base do capítulo em hexágono de <i>R. sanguineus</i> macho; (C) <i>R. sanguineus</i> : poro anal com sulco anal, contornando o ânus posteriormente (fêmea) (originais). ....	72
Figura 17: (A) <i>Ctenocephalides felis</i> , observação em microscópio estereoscópico; (B) <i>Ctenocephalides felis</i> , observação em M.O. (originais). ....	72
Figura 18: (A) <i>Eppendorf's</i> com soro e microplaca com PBS e amostras diluídas; (B) estufa onde foram colocadas as lâminas à temperatura de 37°C; (C) Lavagem das lâminas (passo 12b) (originais).....	131

Figura 19: (A) passo II-2 da técnica de Ziehl-Neelsen; (B) Secagem das lâminas após a coloração pela técnica Ziehl-Neelsen (passo II-7) (originais) .....132

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de pessoas recenseadas no concelho de Vila Franca de Xira e número de cães licenciados referentes ao ano de 2011, distribuídos pelas respetivas freguesias. ....	39
Tabela 2: Métodos de diagnóstico utilizados para os diferentes agentes parasitários. ....	42
Tabela 3: Características dos animais capturados (amostra populacional). ....	133
Tabela 4: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais do sexo feminino (n=33), por fase reprodutiva. ....	47
Tabela 5: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por grupo etário. ....	48
Tabela 6: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por raça. ....	49
Tabela 7: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais por porte corporal. ....	49
Tabela 8: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais por tamanho do pêlo. ....	50
Tabela 9: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por trimestre de captura. ....	50
Tabela 10: Sinais observados durante o exame de estado geral dos animais na amostra. ....	137
Tabela 11: Resultados obtidos pelas técnicas/metodologias efectuadas na amostra populacional (n=80). ....	139
Tabela 12: Frequência absoluta e relativa (%) dos sinais clínicos observados nos animais positivos a <i>L. infantum</i> (N=23) ....	53
Tabela 13: Frequência absoluta e prevalência aparente de animais infetados com <i>L. infantum</i> por época do ano, comprimento do pêlo e idade. ....	54
Tabela 14: Associação estatística entre a infeção por <i>L. infantum</i> e a época do ano, comprimento do pêlo, idade e sexo. ....	55
Tabela 15: Frequência absoluta e prevalência aparente (%) de animais infetados com <i>L. infantum</i> por idade e respetiva associação estatística. ....	55
Tabela 16: Sensibilidade (%) e Especificidade (%) dos testes de diagnóstico efetuados para os vários agentes hemoparasitários. ....	56
Tabela 17: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respetivos intervalos de confiança a 95%, dos hemoparasitas testados por IFI na amostra da população. ....	56
Tabela 18: Tipos de co-infeções observadas, frequência absoluta e frequência relativa de animais co-infetados. ....	59
Tabela 19: Frequência absoluta e prevalência aparente (%) de animais infetados com <i>B. canis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>E. canis</i> e <i>R. conorii</i> , por presença de ixodídeos, época do ano e idade. ....	59
Tabela 20: Associação estatística entre a infeção por <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>R. conorii</i> e a presença de ixodídeos e a época do ano. ....	60

Tabela 21: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respectivos intervalos de confiança de 95%, de <i>D. immitis</i> , pelo teste <i>Speed Diro</i> , na amostra populacional. ....	60
Tabela 22: Número e prevalência (%) de animais com microfilárias de <i>D. immitis</i> e <i>A. reconditum</i> , observado ao M.O., utilizando-se a técnica de Knott modificada. ....	61
Tabela 23: Frequência absoluta e prevalência de animais infetados com <i>D. immitis</i> por idade, época do ano e comprimento do pêlo. ....	62
Tabela 24: Associação estatística entre a infecção por <i>D. immitis</i> e a idade, época do ano e comprimento do pêlo. ....	62
Tabela 25: Frequência absoluta e prevalência (%) dos parasitas intestinais detetados pelas técnicas de Willis e Ziehl-Neelsen. ....	63
Tabela 26: Número de animais parasitados e respetiva prevalência, co-infecções e respetiva prevalência, por grupo de parasitas intestinais, na amostra em estudo (n=80). ....	66
Tabela 27: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por grupo etário, na amostra populacional (n=80). ....	67
Tabela 28: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por grupo etário, na amostra populacional (n=80). ....	68
Tabela 29: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por época do ano, na amostra populacional (n=80). ....	68
Tabela 30: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por sexo, na amostra populacional (n=80). ....	69
Tabela 31: Frequência absoluta, frequência relativa (%) e associação estatística entre a presença de <i>R. sanguineus</i> e <i>C. felis</i> e a época do ano. ....	72
Tabela 32: Frequência absoluta, frequência relativa (%) e associação estatística entre a presença de <i>R. sanguineus</i> e a variável meses do ano. ....	73
Tabela 33: Quantidade (µl) de amostra e PBS necessárias para as diluições na técnica de imunofluorescência indirecta, consoante os kit utilizados na pesquisa dos vários agentes etiológicos e os limiares de positividade ....	131
Tabela 34: Prevalências de hemoparasitas em cães por estudos realizados por outros autores em diferentes países/loais. ....	142
Tabela 35: Prevalências de parasitas intestinais obtidos por estudos realizados por outros autores em diferentes países. ....	144

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra pelas freguesias onde foram capturados. ....	47
Gráfico 2 – Proporção de animais do sexo masculino e feminino do estudo. ....	47
Gráfico 3: Temperaturas Máxima e Mínima registadas registada na estação meteorológica de Lisboa, nos meses de Outubro de 2011 a Setembro de 2012 ( <a href="http://www.ipma.pt">www.ipma.pt</a> ). ....	51
Gráfico 4: Precipitação Máxima Diária, registada na estação meteorológica de Lisboa, nos meses de Outubro de 2011 a Setembro de 2012 ( <a href="http://www.ipma.pt">www.ipma.pt</a> ). ....	51
Gráfico 5: Proporção de animais com sinais clínicos de doença e sem sinais clínicos de doença, no exame de estado geral. ....	52
Gráfico 6: Prevalência infeção por <i>L. infantum</i> pela técnica de IFI. ....	53
Gráfico 7: Proporção de resultados positivos e positivos fracos, dos hemoparasitas testados por IFI, na população amostrada. ....	58
Gráfico 8: (A) Animais com fezes diarreicas (n=8) e presença/ausência de parasitas; (B) animais com parasitas (n=58) e presença/ausência de fezes diarreicas. ....	65
Gráfico 9: Proporção de co-infecções parasitárias intestinais, infeções únicas e ausência de parasitas (n=80). ....	66
Gráfico 10: Prevalência (%) de animais com infeções parasitárias por nemátodes, céstodes e protozoários por época do ano, na amostra populacional (n=80). ....	69
Gráfico 11: Número de animais que apresentaram ácaros na amostra populacional em que efetuou raspagem cutânea (n=20). ....	70
Gráfico 12: Número e prevalências de ectoparasitas identificados ao microscópio estereoscópio, na amostra populacional (n=80). ....	71



## Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius  
µl – Microlitro  
µm – Micrómetro  
AGC – Anaplasmosse granulocítica canina  
ALT – Alanina-Aminotransferase  
ARDS – Síndrome de insuficiência respiratória aguda (do inglês *Acute respiratory distress syndrome*)  
BID – duas vezes por dia  
CID – Coagulação intravascular disseminada (do inglês *Disseminated intravascular coagulopathy*)  
CVBD – Doenças caninas transmitidas por vectores (do inglês *Canine vector-borne diseases*)  
DALY – nº de anos perdidos devidos a períodos de doença, a incapacidade ou a morte prematura (do inglês *disability-adjusted life years*)  
DAT – Técnica de aglutinação direta (do inglês *Direct agglutination technique*)  
DCTI – Doenças caninas transmitidas por ixodídeos  
DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária  
DGS – Direção-Geral da Saúde  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)  
EMC – Erliquiose monocítica canina  
EUA – Estados Unidos da América  
FAS – Fosfatase alcalina sérica  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária  
GLDH – Glutamato desidrogenase (do inglês *Glutamate dehydrogenase*)  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency virus*)  
IC – Intervalo de confiança  
IFI – Imunofluorescência indirecta  
IM – Via intramuscular  
INE – Instituto Nacional de Estatística  
IRIS - Sociedade Internacional de Interesse Renal (do inglês *International Renal Interest Society*)  
Kg – Quilograma  
LC – Leishmaniose cutânea  
LCan – Leishmaniose canina  
LH – Leishmaníase humana  
LV – Leishmaniose visceral  
LVC – Leishmaniose viscero-cutânea  
ml – Mililitro  
MO – Microscópio óptico  
MSF- febre maculosa do Mediterrâneo (do inglês *Mediterranean spotted fever*)  
n – número de animais  
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês *World Organization for Animal Health*, com origem do francês *Office International des Epizooties*)  
OR – *Odds Ratio*  
PBS – Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)  
PCR – Reação em cadeia pela polymerase (do inglês *in Polymerase chain reaction*)  
PI – Período de incubação  
PO – Por via oral (do inglês *Per os*)  
P.V. – Peso vivo  
RPM – Rotações por minuto  
SNC – Sistema nervoso central  
SC - Via subcutânea  
SID – uma vez por dia  
spp. – Espécies  
SRIS – Síndrome sistémica de resposta inflamatória (do inglês *Systemic response inflammatory syndrome*)  
UL – Universidade de Lisboa  
WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)  
WB – ensaio imunoenzimático (do inglês *Immunoblotting*, também conhecido como *Western Blotting*)

## Capítulo I. Introdução

As relações próximas dos animais de companhia e as pessoas, trazem a estas, benefícios, quer sociais, quer de saúde mental, quer de bem-estar físico. Contudo, pode também trazer-lhe agentes zoonóticos (Paul, King & Carlin, 2010). Muitos destes agentes são parasitas do cão, do Homem e dos demais seres vivos, podendo causar desde efeitos mínimos ou, no outro extremo, a morte do hospedeiro. No decurso das parasitoses são importantes vários fatores como a espécie de parasita e o número destes presentes, a espécie de hospedeiro, o seu estado de saúde e a resposta imunitária apresentada, entre outros. Assim, vários graus de parasitismo podem advir, com consequente doença clínica ou não, diferentes graus de gravidade e diversas respostas do hospedeiro. Na sua maioria, os animais parasitados apresentam-se imunologicamente mais deprimidos, quando comparados com os demais, tornando-se mais susceptíveis a novas infeções virais, bacteriológicas, fúngicas e até parasitárias. A capacidade que o hospedeiro tem de criar uma resposta ao parasita, de forma a eliminá-lo, depende também de variados fatores inerentes quer ao hospedeiro, quer ao parasita, sendo a relação parasita-hospedeiro diferente de animal para animal.

Os animais errantes, ou seja, que andam de um lado para o outro sem se fixarem (Léxico-dicionário português online, 2012), são uma população particularmente importante em medicina veterinária e em parasitologia, quer pela facilidade de infeção, quer pela inexistência de medidas profiláticas, quer, ainda, por constituírem ótimos reservatórios, permitindo a manutenção do agente no biótopo e a dispersão para áreas não endémicas. Esta população tem vindo a aumentar em todo mundo, pelo que deverá ser esperado o aumento da prevalência de parasitoses (Dubná *et al.*, 2007, citado por Magalhães & Mateus, 2012). O contacto directo ou indirecto dos cães errantes com o Homem é fácil, por estes deambularem, sem restrições, por toda a via pública, jardins e parques infantis. A alimentação inadequada e a ausência de cuidados de higiene e de abrigo, tornam-nos mais fragilizados no combate às parasitoses, podendo exibir respostas de defesa menos adequadas, com quadros clínicos mais exacerbados, quando comparados com os cães domesticados.

O facto do autor desenvolver nos últimos anos, actividade profissional como médico veterinário municipal, em Vila Franca de Xira, coloca-o em boas condições para investigar e trabalhar com os cães errantes. A escolha do tema deveu-se ao reduzido número de estudos de agentes parasitários na população canina errante em Portugal, e, nomeadamente, no concelho de Vila Franca de Xira. Salienta-se a fase específica em que decorreu o estudo, ou seja, o momento de recolha de amostras, que se pretendeu ser o mais fidedigno da realidade desta população, excluindo-se potenciais situações de infeção parasitária de animais fora do seu habitat normal (“as ruas do concelho de Vila Franca de Xira”).

Assim, este estudo incidiu sobre um vasto leque de parasitas do cão, *Canis familiaris*, presentes em vários departamentos orgânicos: parasitas de células do sangue e do sistema macrofágico fagocitário, parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas, parasitas do aparelho digestivo e ectoparasitas, sendo muitos deles, agentes zoonóticos. Ir-se-á abordar, com maior relevância, parasitas com transmissão vetorial, pela crescente dispersão de vetores e respectivos agentes, essencialmente devido a alterações climáticas, condicionantes sócio-económicas, abandono dos animais, entre outras. A população canina errante é por muitos considerada preponderante, na

manutenção de focos de infeção, devido ao seu estreito e fácil contacto com os vetores. A extensão do estudo, nomeadamente o número elevado de parasitas que serão abordados, tem como intenção, relacionar a problemática da população canina errante, com a saúde pública e a saúde animal. No entanto, o grande número de espécies parasitárias do cão, dificulta a pesquisa de todas, pelo que se optou por uma abordagem, o mais ampla possível, que permitisse responder à questão: constituirá a população canina errante do concelho de Vila Franca de Xira, uma fonte parasitária considerável, para as pessoas e outros animais?

## Capítulo II. Revisão bibliográfica

### 1. Parasitas de células do sangue e do sistema macrofágico fagocitário

De seguida serão descritos agentes parasitários do sistema macrofágico fagocitário (*Leishmania infantum*) e vários hemoparasitas (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Rickettsia conorii*) existentes em Portugal. Serão, ainda, abordados *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis*, ambos hemoparasitas, por poderem ser encontrados nas técnicas efetuadas.

#### 1.1. Protozoários

##### 1.1.1. *Leishmania infantum*

O género *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Gramiccia, 2011), sendo o agente etiológico da leishmaniose canina (LCan), uma doença endémica em mais de 70 países (Solano-Gallego *et al.*, 2011), desde a bacia do Mediterrâneo ao Médio Oriente e América Latina. As prevalências são muito elevadas no nordeste do Brasil e em países do Mediterrâneo, contudo, ocorrem surtos ocasionais, em áreas não endémicas, como os reportados no Canadá e EUA e em países do Norte da Europa (Gramiccia, 2011). A grande maioria das estirpes de *L. infantum* detectadas pertencem ao zimodeme MON-1 (Gramiccia, 2011; Dedet *et al.*, 2013).

Em Portugal, a espécie existente é *L. infantum* (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008), conhecida, na América Central e América do Sul, por *L. chagasi* (Andrade, 2011; Gramiccia, 2011). O cão é o principal reservatório de *L. infantum* (Gramiccia, 2011; Dedet *et al.*, 2013), existindo, no entanto, importantes reservatórios silváticos como a raposa, o chacal e o lobo (Pereira, 2008; Dedet *et al.*, 2013). Outras espécies de *Leishmania* podem, também, ser encontradas no cão, como *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis* (Tomás & Romão, 2008; Solano-Gallego, 2009; Gramiccia, 2011), *L. tropica*, *L. donovani* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Gramiccia, 2011) e *L. amazonensis* (Gramiccia, 2011). Noutros reservatórios, podem, ainda, ser encontradas, as espécies *L. major*, *L. archibaldi*, *L. aegyptica*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* e outras (Tomás & Romão, 2008; Dedet *et al.*, 2013).

As espécies de *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxeno, ocorrendo parte do seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (forma promastigota) e outra parte no hospedeiro vertebrado (forma amastigota). A forma promastigota é extracelular, flagelada, fusiforme, apresentando cerca de 15 x 3 µm, enquanto a forma amastigota é ligeiramente ovóide, com cerca de 2 x 4 µm e um flagelo rudimentar. A infeção do vetor fêmea dos géneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* na América ocorre durante a sua refeição de sangue no hospedeiro vertebrado, com a ingestão de macrófagos infectados com amastigotas (Tomás & Romão, 2008). Estes sofrem posterior diferenciação, no intestino do vetor (6 a 10 dias), passam por várias formas intermédias, originando a forma promastigota metacíclica (infectante para o hospedeiro vertebrado) (Gossage, Rogers & Bates, 2003). Após introdução no hospedeiro, os promastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas da pele e diferenciam-se em amastigotas, podendo, esta forma, disseminar para outros locais da pele, e, através do sangue e linfa, para outras regiões do

corpo, como o fígado, o baço e a medula óssea (Tomás & Romão, 2008). Posteriormente, replicam-se e libertam-se, infectando novos monócitos-macrófagos e verificando-se uma tendência de localização em tecidos com elevado número destas células (Paltrinieri, Ravicini, Rossi & Roura, 2010). Contudo, pode em situações atípicas, ser encontrado no músculo estriado, no sistema nervoso central, em glândulas endócrinas e gónadas, com perda ou não da sua respetiva função (Manzillo *et al.*, 2009). As formas amastigotas possuem enzimas que ajudam a resistir aos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Alexandre-Pires & Correia, 2008) e estudos recentes de Vlkova *et al.* (2011) indicam que cães com baixos níveis de IgG2 específicos contra a saliva do flebótomo, apresentam maior risco de se tornarem positivos à infeção por *L. infantum*.

Os vetores flebotomos caracterizam-se por terem cor acastanhada ou cinzenta, comprimento de 2 a 3 mm e serem revestidos por sedas. Têm actividade crepuscular e noturna (horas de menor calor), essencialmente durante o período que se estende da primavera ao outono, enquanto a actividade de *Lutzomyia* decorre durante todo o ano (Afonso & Alves-Pires, 2008, Gramiccia, 2011). Em Portugal, a população de flebotomíneos é composta por: *P. perniciosus* (80,33%), *P. ariasi* (19,06%) e *P. sergenti* (0,61%) (Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino, 2007), sendo os dois primeiros os principais vetores de *L. infantum* (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

Em alguns países da Europa como Portugal, França, Espanha e Itália, e, ainda na Argélia e Brasil, o gato tem sido, também, infectado por *L. infantum* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Maroli *et al.*, 2007; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia, Nunes & Campino, 2008, Maia *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2010; Rougeron, Catzefflis, Hide, De Meeûs & Bañuls, 2011; Gramiccia, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012, Dedet *et al.*, 2013), assim como foram diagnosticados casos leishmaniose cutânea equina por *L. infantum* na Europa (Mancianti, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005; Fernández-Bellon *et al.*, 2006; Gramiccia, 2011) e no continente Americano (Soares *et al.*, 2013), tendo mesmo sido observada infeção mista com *L. brazilienses* (Soares *et al.*, 2013).

Para além do vetor flebotomíneo, existem outras vias de transmissão: vertical (Masucci *et al.*, 2003; Boggiatto *et al.*, 2011; Naucke & Lorentz, 2012), venérea (Rosypal & Lindsay, 2005; Silva *et al.*, 2008; Naucke & Lorentz, 2012), sanguínea (de Freitas, Melo, Costa-Val & Michalick, 2006) e possivelmente, por ixodídeos (Coutinho *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2011, Trotta *et al.*, 2012), nomeadamente *R. sanguineus* (Dantas-Torres *et al.*, 2010a; Trotta *et al.*, 2012. Outros estudos identificaram a infeção noutros vetores: *Ixodes ricinus* (Trotta *et al.*, 2012) e *Ctenocephalides felis* (Ferreira, Fattori, Souza & Lima, 2009), não tendo, no entanto, sido confirmada a sua capacidade vetorial.

Nem todos os animais desenvolvem sintomatologia clínica (Solano-Gallego, Morell, Arboix, Alberola & Ferrer, 2001; Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008), mas os sintomas podem surgir a qualquer momento em cães assintomáticos, principalmente por fatores como imunossupressão ou doenças concomitantes (Solano-Gallego *et al.*, 2011). O diagnóstico precoce da infeção é de elevada importância, para que se evite ou se minimize o aparecimento de lesões e se evite a manutenção de reservatórios parasitários. Os animais sintomáticos, podem apresentar desde uma dermatite papular moderada a uma doença severa, caracterizada por lesões renais com glomerulonefrite por deposição de imuno-complexos. A LCan é uma doença sistémica que pode, potencialmente, envolver qualquer órgão, tecido ou fluido biológico (Solano-Gallego *et al.*, 2009;

Solano-Gallego *et al.*, 2011), podendo apresentar-se sob 3 formas: forma cutânea (LC), forma visceral (LV) e forma víscero-cutânea (LVC) (Alexandre-Pires & Correia, 2008). As lesões cutâneas são as mais observadas, quer isoladas, quer em associação com outros sinais e anormalidades patológicas, tendo já sido descrito: dermatite exfoliativa não-prurítica, com ou sem alopecia generalizada ou localizada à face, orelhas e membros; dermatite ulcerativa em zonas de proeminências ósseas, junções muco-cutâneas, membros e orelhas; dermatite nodular focal ou multifocal, dermatite proliferativa muco-cutânea ou dermatite papular. Atipicamente, pode-se observar despigmentação, hiperqueratose, paniculite, e pústulas. Por vezes ocorre epistaxis (Solano-Gallego *et al.*, 2009) e raramente observam-se lesões na língua (Manzillo *et al.*, 2009). Verifica-se ainda, frequentemente, piodermatite secundária, essencialmente por estafilococos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A forma visceral (LV) é caracterizada por emagrecimento ou mesmo caquexia, apatia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, lesões oculares, queratoconjuntivite, onicogribose, depressão, vômito, diarreia, debilidade muscular, tosse, espirro, melena, febre, rinite, uveíte, dor e edema articular (Nelson & Couto, 2001, de Freitas *et al.*, 2012, Melo *et al.*, 2013). Podem ainda, ocorrer sinais neurológicos como convulsões (Melo *et al.*, 2013). Segundo recomendações da Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) é de extrema importância a avaliação da função renal para o prolongamento da vida do animal (Zatelli *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As lesões cutâneas surgem, muitas vezes, em simultâneo com as viscerais, designando-se, então, por LVC (Alexandre-Pires & Correia, 2008), sendo esta forma e a LV, as mais graves, podendo levar à morte (Gramiccia, 2011). Na figura 4 encontram-se alguns dos sinais clinicamente mais observados. Laboratorialmente, verifica-se frequentemente anemia, trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, hipoalbuminemia, urémia, hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia (de Freitas *et al.*, 2012). Os métodos de diagnóstico eficazes devem ser capazes de detectar portadores assintomáticos, além de confirmarem os suspeitos clínicos, devendo assim, apresentar uma alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Maia, Rolão, Nunes, Gonçalves & Campino, 2007). O diagnóstico definitivo pode ser efectuado por citologia (aspirados de medula óssea, de linfonodos ou de lesões na pele), observando-se a presença de *Leishmania* (forma amastigota) livre ou no interior de monócitos, macrófagos ou neutrófilos, utilizando-se uma coloração de Wright ou Giemsa (Nelson & Couto, 2001; Medleua & Hnilica, 2003; Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011). Pode-se recorrer à imuno-histoquímica (biópsia cutânea), detectando o antígeno de *Leishmania* spp. A técnica de PCR é bastante fiável, quer em situações de infeção activa, quer nos assintomáticos (Cortes, Rolão, Ramada & Campino, 2004). Pode-se, ainda, recorrer técnica de aglutinação directa (DAT), sendo pouco dispendiosa, de fácil leitura e interpretação, ou a sua variante, o teste de aglutinação rápida (FAST), onde se combina uma maior concentração de parasitas em menor volume de reagentes (Cardoso *et al.*, 2004b). Pode ser efectuado diagnóstico serológico, através das técnicas de *Western Blotting* (WB), ensaio imunoenzimático (ELISA), testes rápidos imunocromáticos e imunofluorescência indirecta (IFI). A técnica WB é limitada por estar pouco padronizada. A técnica ELISA e o teste rápido imunocromático podem ser usados de forma rápida e simples, sendo o primeiro em laboratório e o segundo pelo próprio clínico, contudo a sensibilidade é média-alta e não indicam o título de anticorpos. Nas recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico

serológico, a técnica de imunofluorescência indirecta, é a de referência, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de anticorpos anti-*L. infantum* no soro, variando o limiar de positividade com as técnicas empregues e os laboratórios e, possibilitando a distinção de infecções subclínicas, com baixos títulos de anticorpos (Gramiccia, 2011). A seroconversão pode ocorrer no período de 1 a 22 meses após a infeção, sendo, em média, 5 meses (Oliva *et al.*, 2006).

Os tratamentos preconizados contra a LCan são muito variados, envolvendo vários fármacos e diferentes combinações e dosagens. Segundo Solano-Gallego *et al.* (2009), a 1ª linha de tratamento é a associação de antimoniato de glucamina (Glucantime®) com alopurinol (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009) ou, alternativamente, a miltefosina (Milteforan®) (Andrade *et al.*, 2011). Existem, ainda, estudos com eficácia demonstrada no uso de outros fármacos: associação de metronidazole e espiamicina (Pennisi *et al.*, 2005), anfotericina B (Cortadellas, 2003), marbofloxacin (Rougier, Vouldoukis, Fournel, Pérès & Woehrlé, 2008). Contudo, em qualquer das alternativas terapêuticas, os animais permanecem parasitologicamente positivos, ocorrendo apenas uma remissão temporária dos sinais, uma diminuição do título de anticorpos anti-*Leishmania* e uma melhoria da resposta imunitária do indivíduo (Rougier, Hasseine, Delaunay, Michel & Marty, 2012). Recentes estudos “*in vitro*” de Franco, Pereira, Pereira da Fonseca, Santos-Gomes & Ferreira (2012) revelaram-se promissores no uso de fluoroquinolonas, essencialmente pelos poucos efeitos secundários. Como complemento da terapêutica leishmaniosstática pode ser administrado um estimulante imunitário, como a domperidona (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009) e pode ser usada a prednisolona no controlo das alterações hemostáticas (Cortese *et al.*, 2008). Pelas resistências ao parasita verificadas experimentalmente pelo alopurinol deve-se evitar o seu uso em monoterapia (Maia *et al.*, 2013a). Profilaticamente, deve ser utilizada uma vacina eficaz contra *L. infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2011), o uso adicional de produtos repelentes e insecticidas (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Molina, Miró, Gálvez, Nieto & Descalzo, 2006; Manzillo *et al.*, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008; Meireles, 2008; Maroli *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011, Molina *et al.*, 2012), resguardar os animais dentro da habitação nos períodos de maior actividade do vetor e uso de redes mosquiteiras com ou sem impregnação com piretróides (Killick-Kendrick, 1999; Afonso & Alves-Pires, 2008) e rastreio em dadores de sangue (Crawford, Walton, Lewis, Tasker & Warman, 2013). A 1ª vacina disponível na Europa (Canileish, Virbac, França) foi lançada em Portugal no ano de 2011 (Moreno *et al.*, 2012).

A leishmaniose causada pelo agente *L. infantum* (= *L. chagasi* no Novo Mundo) é a maior zoonose potencialmente fatal para cães e humanos (Solano-Gallego, 2009; Cardoso, Mendão & Carvalho, 2012), sendo designada de leishmaníase (LH) no Homem (OMS, 2010). As outras espécies de *Leishmania* encontradas no cão parecem não ter importância para a infeção no Homem (Dantas-Torres, 2007). Estima-se que, todos os anos, a LH atinja cerca de 1,5 a 2 milhões de crianças e adultos (forma cutânea em cerca de 1 a 1,5 milhões e a forma visceral em 0,5 milhões) e 2,4 milhões de anos perdidos devido a períodos de doença, a incapacidade ou morte prematura (DALY), em 88 países, causando 70.000 mortes, com uma prevalência muito superior em países subdesenvolvidos. Ainda, cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a doença. (Desjeaux, 2004; Solano-Gallego, 2009; Dedet *et al.*, 2013). É, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), uma das doenças tropicais mais negligenciadas (Gramiccia, 2011). A LH visceral (também

conhecida como “Kala-azar”) é a forma clínica mais frequentemente associada com o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (Desjeaux & Alvar, 2003). As crianças subnutridas apresentam, também, um risco muito mais elevado de LH visceral (Desjeaux, 2004). Tanto a LCan, como a LH são doenças de declaração obrigatória em Portugal. No período de 2004 a 2008 foram notificados à Direção-Geral de Saúde, 79 casos de LH por todo o país, sendo 37 respeitantes à Região de Lisboa e Vale do Tejo (DGS, 2010). Nos cães, a notificação de LCan é efectuada pelos médicos veterinários clínicos e médicos veterinários municipais. O abate de animais infectados é recomendado pela OMS, sendo tal medida questionável, principalmente, pelo número reduzido de abates de animais infectados, por problemas logísticos e operacionais, pelo restabelecimento da população errante por animais susceptíveis à infeção, ou ainda, pela possível existência de outro reservatório responsável pela manutenção de *L. infantum* (Da Silva *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011).

### 1.1.2. *Babesia* spp.

O género *Babesia* pertence ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Babesiidae, sendo composto por várias espécies, algumas das quais responsáveis pela babesiose canina (Vial & Gorenflot, 2006). É fenotipicamente semelhante ao género *Theileria* (filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Theileriidae), sendo por isso, e por infetarem os eritrócitos de mamíferos, designados por piroplasmas (Irwin, 2009). As espécies de *Babesia* mais comuns que infectam o cão, podem ser de grandes dimensões (2,5 x 5 µm), sendo designados de *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (antigamente considerados subespécies de *B. canis*) ou podem ser de pequenas dimensões (1 x 2,5 µm), designando-se de *B. gibsoni* (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Ao microscópico óptico, as espécies de grandes dimensões são, tipicamente, encontradas nos eritrócitos, como corpos piriformes ou em forma de anel, normalmente aos pares, podendo também ocorrer de forma isolada. Por sua vez, *B. gibsoni* encontra-se isoladamente nas hemácias, apresentando forma pleomórfica, oval, circular ou em anel (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob, Hackner & Prittie, 2010). Outras espécies de *Babesia* podem, menos comumente, infectar o cão, causando doença, como *Babesia conradae*, *Babesia microti-like* (também designado de *Theileria annae*) e, mais recentemente, uma nova espécie de *Babesia* de grandes dimensões, sem nome definido (Lehtinen, Birkenheuer, Droleskey & Holman, 2008; Irwin, 2009; Sikorski *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Foi ainda identificada, uma espécie capaz de infectar o cão, denominada *Babesia caballi* (Fritz, 2010), e ainda, um piroplasma filogeneticamente muito semelhante a *Babesia*, *Rangelia vitali* (Da Silva *et al.*, 2011a). No género *Theileria*, existem quatro espécies (*Theileria annae*, *Theileria equi*, *Theileria annulata* e *Theileria* sp.) que podem infectar o cão (Irwin, 2009; Fritz, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A infeção do hospedeiro ocorre durante a refeição sanguínea do ixodídeo e após a maturação de esporozoítos infecciosos no intestino do vetor (Solano-Gallego & Baneth, 2011). De seguida, os esporozoítos infectam os eritrócitos, onde se diferenciam em merozoítos e depois em trofozoítos (Taboada & Lobetti, 2006). Posteriormente, dividem-se por esquizogonia, formando pares identificados em várias espécies de *Babesia*, podendo mesmo, os merozoítos, continuar a dividir-se



formando oito ou mais indivíduos, provocando a lise celular, extravasão para a corrente sanguínea e infecção de outros eritrócitos (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A infecção do ixodídeo ocorre por ingestão de eritrócitos parasitados com merozoítos do hospedeiro definitivo (Ayoob *et al.*, 2010). No intestino deste vetor, ocorre o desenvolvimento sexual, seguido de esporogonia nos seus tecidos, com a formação do zigoto que migra, posteriormente, para as glândulas salivares (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009, Ayoob *et al.*, 2010). Normalmente, ocorre a transmissão transtadial (infecção persiste de um estágio ao seguinte), mas também pode haver transmissão transovárica (através do ovo de uma geração à seguinte) (Uilenberg, 2006, Taboada & Lobetti, 2006; Chauvin *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A diferença do ciclo de vida de *Theileria* spp. é que neste género existe uma fase do ciclo no hospedeiro, que é pré-eritrocitária, com infecção de leucócitos (Taboada & Lobetti, 2006; Chauvin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011) e não se verifica transmissão transovárica (Uilenberg, 2006; Vial & Gorenflot, 2006). Pode ocorrer transmissão de *B. canis* e *B. gibsoni* por transfusões sanguíneas (Reine, 2004; Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2013), estando demonstrado que *B. gibsoni* pode ser transmitido por via transplacentária, por equipamento contaminado e, possivelmente, por via directa de cão para cão, através de feridas, saliva e ingestão de sangue, dado ser encontrada especialmente em cães utilizados em lutas (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A babesiose canina é uma doença com distribuição mundial (Irwin, 2009), encontrando-se em expansão na Europa (Halos *et al.*, 2013). Apesar de muito semelhantes morfologicamente, *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* apresentam uma distribuição geográfica muito diferente (muito dependente dos vetores), assim como especificidade de vetores, características genéticas e sintomatologia induzida aos cães (Matijatko, Torti & Schetters, 2012). *B. canis* verifica-se sobretudo na Europa, incluindo Portugal, sendo transmitida por *Dermacentor reticulatus* (Cardoso *et al.*, 2010; René-Martellet, Chêne, Chabanne, Chalvet-Monfray & Bourdoiseau, 2013; Kubelová, Sedlák, Panev & Široký, 2013; Schaarschmidt *et al.*, 2013), enquanto que, *B. rossi* encontra-se na Europa, Ásia e, principalmente, África, sendo transmitida por *Haemaphysalis elliptica* (Matijila, Leisewitz, Jongejan & Penzhorn, 2008; Matijila *et al.* 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Goddard, Wiinberg, Schoeman, Kristensen & Kjelgaard-Hansen, 2013). Já *B. vogeli* e *B. gibsoni* têm uma distribuição mais global, encontrando-se no Velho e Novo Mundo (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Além de *B. canis*, também *B. vogeli* encontra-se em Portugal, sendo transmitida pelo ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (Irwin, 2009; Cardoso *et al.*, 2010). *B. gibsoni* é endémico na Ásia, sendo transmitido por *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis bispinosa* (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen & Morrison, 2012). Também *B. microti-like* (*T. annae*) foi identificada em Portugal (Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2011).

A possibilidade de infecção por transfusões sanguíneas e directamente, de cão para cão, através de lutas e, ainda, a existência de alguns portadores saudáveis poderá ter favorecido o alastramento da doença (Solano-Gallego & Baneth, 2011). No futuro, fatores como as alterações climáticas, a migração vetorial e o aumento da frequência de viagens dos animais domésticos, poderão vir a afetar a sua distribuição (René-Martellet *et al.*, 2013).

A patogenia da doença varia por fatores inerentes à espécie de *Babesia* (virulência, número de parasitas que penetram no hospedeiro e ritmo de penetração), fatores inerentes ao hospedeiro (idade, estado de nutrição, estado imunitário, presença de doenças concomitantes) e ainda, se é primoinfecção ou reinfecção (Campillo & Vázquez, 1999; Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011; René-Martellet *et al.*, 2013). *B. rossi* é a espécie mais patogénica (Ayoob *et al.*, 2010; Goddard *et al.*, 2013), sendo *B. vogeli* a menos severa (Ayoob *et al.*, 2010).

A forma não complicada da doença causa, normalmente, anemia, enquanto a forma complicada é acompanhada de uma síndrome responsiva inflamatória sistémica (SRIS) e síndrome de disfunção orgânica múltipla, provocando insuficiência hepática ou renal, pancreatite aguda, coagulação intravascular disseminada, anemia hemolítica imunomediada e síndrome de insuficiência respiratória aguda (ARDS) (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego, 2011; Matijatko *et al.*, 2012; Zygner, Gójska-Zygner, Wesotowska & Wędrychowicz, 2013).

A apresentação clínica da babesiose é variável, podendo ser hiperaguda, aguda, crónica, subclínica e inclusivé, atípica (Ayoob *et al.*, 2010; Goddard *et al.*, 2013). Os sinais mais comuns são: febre, perda de peso, vômito, apatia, mucosas pálidas, depressão, hematuria, esplenomegália e trombocitopenia (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Matijatko *et al.*, 2012; Zygner *et al.*, 2013; René-Martellet *et al.*, 2013, Halos *et al.*, 2013), podendo ainda ocorrer hipotensão, rabdomiólise, ascite, edema pulmonar, sintomatologia nervosa e choque (Solano-Gallego & Baneth, 2011). De acordo com a espécie de *Babesia* e gravidade da infeção pode-se verificar várias alterações laboratoriais: trombocitopenia, anemia não regenerativa, neutropenia, bilirrubinemia, bilirrubinúria, pigmentúria, leucopenia ou leucocitose, hemoglobulinemia, hemoglobulinúria, bilirrubinemia, bilirrubinúria, alcalose/acidose metabólica, azotemia, hipoglicemia e hiperlactemia (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A infeção hiperaguda é rara e apresenta uma taxa de mortalidade elevada, sendo *B. rossi* a espécie que causa manifestações clínicas mais graves (Matijala *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Já *B. canis* causa doença moderada a grave, com baixa parasitemia, enquanto, *B. vogeli* provoca doença leve a moderada, sendo muitas vezes subclínica e ocorrendo normalmente em animais com doenças concomitantes ou esplenectomizados (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

O diagnóstico definitivo pode ser feito por observação do parasita nos eritrócitos, em esfregaços sanguíneos de sangue periférico, utilizando-se os corantes de Wright ou de Giemsa, especialmente nas infecções agudas, com uma parasitemia moderada a elevada (Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Halos *et al.*, 2013). A IFI detecta os anticorpos anti-*Babesia* em animais infectados ou expostos, sendo o teste indirecto mais específico e o teste de diagnóstico óptimo para infecções ocultas. Alguns autores sugerem que, titulações de *B. canis*  $\geq 1:80$  ou, 4 aumentos progressivos no valor das titulações, é suficiente para diagnosticar uma infeção activa. Pode-se, ainda, recorrer a testes ELISA, dot-ELISA e PCR (Ayoob *et al.*, 2010, Solano-Gallego & Baneth, 2011).

O tratamento pode ser efetuado por dipropionato de imidocarb ou aceturato de diminazeno (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). No caso de *B. gibsoni*, o tratamento deve ser efetuado com azitromicina ou clindamicina (Sakuma, Setoguchi & Endo, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-

Gallego & Baneth, 2011). Estão a ser investigadas drogas, como o artesunato (Goo *et al.*, 2010) e epoxomicina (AbouLaila, Nakamura, Govind, Yokoyama & Igarashi, 2010). A forma mais eficaz de prevenção é efetuada pelo controlo do vetor (Fourie, Stanneck & Jongejan, 2013) e por vacinação contra *B. rossi* e *B. canis* (Nobivac Piro; Intervet) ou apenas *B. canis* (Pirodog; Merial) (Adaszek, Puchalski, Dec & Winiarczyk, 2012). Deve ser, ainda, efectuado rastreio nos dadores de sangue (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Crawford *et al.*, 2013).

A babesiose é uma zoonose emergente encontrada em pessoas na Europa e no Nordeste e Oeste dos Estados Unidos da América (E.U.A.) (Ayoob *et al.*, 2010), tendo já sido identificada *B. divergens* (na Europa), *B. equi* (E.U.A.), alguns casos de *B. microti* (na Europa e EUA) (Hildebrandt *et al.*, 2007; Hunfeld, Hildebrandt & Gray 2008) e *B. canis* (pouco documentado) (Taboada & Lobetti, 2006).

### 1.1.3. *Hepatozoon canis*

*Hepatozoon canis* (James, 1905) é o agente causador da hepatozoonose canina (Otranto *et al.*, 2011; Dantas-Torres, 2012). É um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, família Hepatozoidae, sendo transmitido ao cão, por ingestão do ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, tendo, no entanto, sido detectadas outras espécies vetoras (Jittapalapong, Runghphisutthipongse, Maruyama, Schaeffer & Stich, 2006; Otranto *et al.*, 2011; Baneth, 2011; Danta-Torres, 2012; Giannelli *et al.*, 2013). O cão (hospedeiro intermediário) infeta-se por ingestão do ixodídeo (hospedeiro definitivo) (Jittapalapong, 2006; Baneth, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2012) ou de partes do ixodídeo que contenham oocistos maduros com esporozoítos (Giannelli *et al.*, 2013). Após a sua ingestão, os esporozoítos são transportados pelo sangue ou pela linfa, para os órgãos do sistema macrofágico fagocitário (baço, fígado, gânglios linfáticos, medula óssea) e também para os pulmões e musculatura estriada (Otranto *et al.*, 2011; Baneth, 2011; Giannelli *et al.*, 2013), onde ocorre a merogonia, com a formação de macroesquizontes e microesquizontes, e, posteriormente, macromerozoítos e micromerozoítos, respectivamente (Baneth, 2011). A gametogénese ocorre em leucócitos, especialmente em neutrófilos e monócitos (Jittapalapong, 2006; Otranto *et al.*, 2011; Baneth, 2011, Giannelli *et al.*, 2013), havendo produção de grandes gametócitos, que coram de azul, têm a forma elipsoidal e possuem cerca de 11 x 4 µm (Baneth, 2011), 28 dias após a ingestão do ixodídeo (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Giannelli *et al.*, 2013). O ixodídeo infecta-se ao ingerir leucócitos contendo gametócitos, em cães parasitêmicos, ocorrendo, no seu intestino, a gametogonia, fecundação e posteriormente, no hemocélio, a esporogonia com formação dos esporocistos que contêm os esporozoítos (Campillo & Vásquez, 1999; Baneth, 2011). Poderá, também, ocorrer a transmissão transtadial (Giannelli *et al.*, 2013) e transuterina (Baneth, 2011; Giannelli *et al.*, 2013). O ciclo de vida completo decorre em, aproximadamente, 81 dias (Giannelli *et al.*, 2013).

*H. canis* é prevalente em África, Ásia, Sul da Europa, América do Sul e, recentemente, nos Estados Unidos (Baneth, 2011; Otranto *et al.*, 2011; Giannelli *et al.*, 2013), sendo a sua prevalência, muito dependente da prevalência do vetor (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

A infecção é muitas vezes subdiagnosticada, por ser normalmente assintomática (Jittapalapong *et al.*, 2006). No entanto, *H. canis* pode provocar uma infecção crónica, com sinais leves a moderados (Otranto *et al.*, 2011). A migração para os tecidos induz uma inflamação piogranulomatosa, que provoca os sinais clínicos, com envolvimento dos músculos (Lappin, 2010). A alteração laboratorial mais frequente é a eosinofilia. O diagnóstico pode ser efectuado por esfregaços de sangue periférico, observando-se os gametócitos no interior dos leucócitos ou por observação dos esquizontes, após biopsia muscular (Otranto *et al.*, 2011). Contudo, a técnica PCR é mais sensível (Jittapalapong *et al.*, 2006).

O tratamento pode ser efectuado com o dipirprionato de imidocarb, podendo ser associado a tetraciclina ou sulfamidas (Da Silva *et al.*, 2011b; Baneth, 2011). Profilaticamente, deve ser efetuado o controlo do vetor no ambiente e evitar a sua ingestão (Baneth, 2011). Já foi reportado a infecção de *Hepatozoon* spp. numa pessoa (Lappin, 2010).

## **1.2. Bactérias**

### **1.2.1. *Anaplasma phagocytophilum***

*Anaplasma phagocytophilum* é o agente causador de anaplasmosse granulocítica canina (AGC). Era, antigamente, designado por *Ehrlichia phagocytophila*, sendo recentemente reclassificada (Dumler *et al.*, 2001). Pertence ao género *Anaplasma*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales, sendo uma bactéria intracelular obrigatória Gram-negativa (Lillini, Macrì, Proietti & Scarpulla, 2006; Ebani, Bertelloni, Turchi & Cerri, 2013). É encontrada em vacúolos citoplasmáticos de granulócitos (neutrófilos/eosinófilos), formando corpos distintos, designados mórulas (Greig & Armstrong, 2006; Ebani *et al.*, 2013).

A infecção ocorre por via vetorial, por inoculação da saliva do ixodídeo infectado, 24 a 48 horas após a refeição sanguínea no hospedeiro (Sukumaran *et al.*, 2006; Carrade, Foley, Borjesson & Sykes, 2009). A transmissão pode ocorrer por via transtadial (Hodzic *et al.*, 1998), por via transovárica (Baldrige *et al.*, 2009) ou *cofeeding* (Woldehiwet, 2010). Por sua vez, os ixodídeos infetam-se ao ingerirem sangue de animais infectados, no período de parasitemia (Nováková & Víchová, 2010). Existem poucas evidências da transmissão vertical (Plier, Breitschwerdt, Hegarty & Kidd, 2009), mas pode ocorrer transmissão por transfusão sanguínea (Reine, 2004).

*A. phagocytophilum* tem sido identificado nos E.U.A., na Europa e na Ásia (Carrade *et al.*, 2009). Na Europa, a transmissão é efectuada pelo vetor *Ixodes ricinus* (Strle, 2004; Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006; Carrade *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012). Em Portugal foi reconhecido também o vetor *I. ventralis* (Santos, Santos-Silva, Almeida, Bacellar & Dumler, 2004; Silva *et al.*, 2006). *A. phagocytophilum*, foi ainda, identificado noutros ixodídeos como *R. sanguineus* (Alberti *et al.*, 2005), *I. trianguliceps* (Ogden, Bown, Horrocks, Woldehiwet & Bennett, 1998), *Haemaphysalis punctata*, *I. persulcatus* (Alekseev *et al.*, 1998; Hamel, Silaghi, Zapadynska, Kudrin & Pfister, 2013). A infecção decorre no período de março a novembro (Granick, Armstrong & Bender, 2009) e a sua gravidade é influenciada por fatores como a estirpe de *A. phagocytophilum*, a presença de outros agentes patogénicos, a idade, o estado imunitário e a condição física do animal e ainda, o clima (Stuenkel, 2007).

Dependendo da localização geográfica, existe uma variedade de mamíferos selvagens, como ratos, esquilos, ratazanas e veados (Carrade *et al.*, 2009) e aves (Machado *et al.*, 2012) que podem ser reservatórios competentes.

Para o diagnóstico de AGC deve ser tido em consideração, além dos sinais clínicos, a época do ano e a história pregressa, sendo muitas infecções subclínicas (Ebani *et al.*, 2013). Nas infecções agudas observa-se, frequentemente, febre, letargia, claudicação, dor musculoesquelética, relutância ao movimento, fraqueza. Pode-se observar, ainda, vômito, diarreia, poliúria, polidipsia, tosse, uveíte, esplenomegália, linfadenopatia, hemorragias espontâneas, disfunção do sistema nervoso e meningite (Egenvall, Hedhammar & Bjöersdorff, 1997; Poitout, Shinozaki, Stockwell, Holland & Shukla, 2005; Ebani *et al.*, 2013). As alterações laboratoriais mais frequentes são: trombocitopenia, linfopenia e leucopenia, podendo, ainda verificar-se anemia, neutropenia, leucocitose, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hiperbilirrubinemia e aumento da FAS (Kohn, Galke, Beelitz & Pfister, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Ebani *et al.*, 2013). A detecção de *A. phagocytophilum* pode ser efectuada directamente, através da observação microscópica das mórulas em granulócitos de sangue periférico, ou pela técnica PCR, ou ainda, indirectamente, por testes serológicos, como os testes ELISA e IFI (Kohn, Silaghi, Galke, Arndt & Pfister, 2011).

O tratamento pode ser efectuado com doxiciclina (Granick *et al.*, 2009) e a profilaxia deve ser efectuada através do controlo de vetores, sendo ainda altamente recomendado o rastreio em dadores de sangue (Kohn *et al.*, 2008, 2011).

*A. phagocytophilum* é a espécie causadora de anaplasmoose granulocítica humana, que existe em todo o mundo e pode provocar desde uma infeção moderada a uma doença grave e debilitante (Rar & Golovljova, 2011; Dumler, 2012; Ebani *et al.*, 2013; Miró, Montoya, Roura, Gálvez & Sainz, 2013).

### 1.2.2. *Ehrlichia canis*

*Ehrlichia canis* é o agente causador da erlichiose monocítica canina (EMC) (Rikihisa, 1991; Miró *et al.*, 2013), sendo uma bactéria pleomórfica, Gram-negativa e intracelular obrigatória que se localiza dentro dos vacúolos dos monócitos e macrófagos, formando mórulas. O género *Ehrlichia* pertence à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. (Dumler *et al.*, 2001; Bowman *et al.*, 2009; Gaunt *et al.*, 2010; Harrus & Waner, 2011; Miró *et al.*, 2013). *E. canis* é transmitida por um vetor ixodídeo, *R. sanguineus* (Stich, Schaefer, Bremer, Needham & Jittapalapong, 2008; Bowman *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2013), podendo ser também transmitida por *Dermacentor variabilis*. Já foi, ainda, detetado nos vetores *H. longicornis* e *I. turdus* (Rar & Golovljova, 2011). A transmissão pode ocorrer por via transtadial (Bremer *et al.*, 2005; Stich *et al.*, 2008), inclusive nos ixodídeos do sexo masculino (Bremer *et al.*, 2005) e transovariana (Stich *et al.*, 2008). A transfusão sanguínea é uma forma possível de infeção (Reine, 2004)

*E. canis* é o agente, transmitido por ixodídeos, mais difundido pelo mundo, tendo sido reportado em África, Ásia, América e Europa (Irwin, 2007; Otranto *et al.*, 2008; Baneth, 2010). Além do cão, pode infectar a raposa, o coioite, o chacal e o lobo (Stich *et al.*, 2008).

EMC é uma doença multissistêmica (Harrus & Waner, 2011), tendo os mecanismos imunopatológicos, um papel importante no aparecimento de sinais clínicos, alterações hematológicas e desenvolvimento de lesões histopatológicas (Villaescusa *et al.*, 2012). As manifestações clínicas podem, ainda, depender de co-infecções, nomeadamente por *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, agentes transmitidos pelo mesmo vetor (Harrus & Waner, 2011). Podem ocorrer três fases (aguda, subclínica e crónica) com diferentes graus de gravidade (Miró *et al.*, 2013). Na fase aguda, observam-se frequentemente os ixodídeos e verificam-se sinais de febre, depressão, letargia, anorexia, fraqueza, linfadenomegália, esplenomegália, dispneia, vômito, mucosas pálidas, tendências hemorrágicas, petéquias, equimoses, epistaxis, lesões oftalmológicas e manifestações neurológicas (Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Waner & Harrus, 2008; Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011; Rar & Golovljova, 2011; Miró *et al.*, 2013). A alteração laboratorial mais comum nesta fase é a trombocitopenia (moderada a grave), podendo ainda, verificar-se leucopenia, anemia leve a moderada e normocítica (Harrus & Waner, 2011; Miró *et al.*, 2013), hiperalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia e aumento da ALT e FAS (Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011). Na fase subclínica, não se observam alterações clínicas e os ixodídeos podem encontrar-se ausentes (Waner *et al.*, 1997; Nelson & Couto, 2001; Harrus & Waner, 2011). Laboratorialmente, pode ser verificado, trombocitopenia, anemia e hiperproteinemia (Miró *et al.*, 2013). Na fase crónica, os ixodídeos encontram-se, frequentemente, ausentes (Nelson & Couto, 2001) e clinicamente, pode ser observada a mesma sintomatologia verificada na fase aguda, mas com maior gravidade, sendo muito frequente a presença de mucosas pálidas, fraqueza, hemorragias e perda de peso acentuada (Harrus & Waner, 2011; Rar & Golovljova, 2011). A constatação de uma trombocitopenia severa, acompanhada de marcada leucopenia e anemia, caracteriza esta fase, essencialmente por uma pancitopenia, devido a hipoplasia medular, não observada nas fases anteriores (Irwin, 2007; Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011). Para o diagnóstico de EMC, deve ser tido em consideração a anamnese, sintomatologia e resultados laboratoriais e, ter sempre presente que, as co-infecções com outros agentes transmitidos por ixodídeos, podem dificultar o diagnóstico. A confirmação de EMC pode ser efectuada pela observação de mórulas de *E. canis* no citoplasma de monócitos e macrófagos, em sangue periférico, tendo, no entanto, uma sensibilidade baixa (Irwin, 2007; Harrus & Waner, 2011). O teste serológico de eleição é o IFI, onde são pesquisados anticorpos IgG anti-*E. canis*, sendo considerados positivos soros com titulações  $\geq 1:40$  (Harrus & Waner, 2011) ou aumento igual ou superior a quatro vezes no título de anticorpos, executando-se 2 testes. Também podem ser efetuados testes ELISA, WB e PCR (Harrus & Waner, 2011).

O tratamento de eleição na fase aguda é a doxiciclina (Harrus, Aroch, Lavy & Bark 1997; Harrus, Kass, Klement & Waner, 1997; Harrus, Waner, Aizenberg & Bark, 1998; Harrus *et al.*, 2004; Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011). Alternativamente, podem ser administradas tetraciclina (Irwin, 2007). Podem ainda, ser administrados glucocorticoides, se houver patologia imunomediada (Harrus *et al.*, 1996b; Komnenou *et al.*, 2007). O controlo de ixodídeos é a melhor forma de prevenção (Otranto *et al.*, 2008), aconselhando-se ainda, o despiste de dadores de sangue, por IFI ou por PCR (mais sensível) (Crawford *et al.*, 2013). Apesar de não existir, no presente, nenhuma vacina contra *E. canis*,

já foram efetuados estudos, indicando a possibilidade de produção de uma vacina utilizando-se uma estirpe de *E. canis* atenuada (Rudoler, Baneth, Eyal, van Straten & Harrus, 2012).

Algumas espécies de *Ehrlichia* são capazes de infectar o Homem, como *E. chaffeensis*, que provoca a ehrlichiose monocítica humana e *E. ewingii*, causadora da ehrlichiose granulocítica humana (Irwin, 2007). A bactéria *E. canis* também já foi reportada em humanos, na Venezuela (Perez, Bodor, Zhang, Xiong & Rikihisa, 2006; Rar & Golovljova, 2011; Cardoso *et al.*, 2012).

### 1.2.3. *Rickettsia conorii*

*Rickettsia conorii* é o agente causador da rickettsiose, também conhecida como a febre maculosa do Mediterrâneo (MSF) (Rovero, Brouqui & Raoult, 2008), uma das primeiras DCTI reconhecida (Socolovschi *et al.*, 2012). Pertence ao género *Rickettsia*, família Rickettsiaceae, ordem Rickettsiales, sendo uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória de células endoteliais, com 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de largura (Dumler *et al.*, 2001; Renvoisé & Raoult, 2009). Existem 4 subespécies: *R. conorii conorii*, *R. conorii indica*, *R. conorii caspia* e *R. conorii israelensis* (Zhu, Fournier, Ereemeeva & Raoult, 2005).

A infeção do hospedeiro ocorre no decorrer da alimentação do ixodídeo (Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2006) e a infeção do ixodídeo ocorre, também, aquando a refeição sanguínea no hospedeiro definitivo em fase de riquetsiemia. Pode haver transmissão por via transtadial, transovárica, não sendo necessário, um hospedeiro vertebrado para a manutenção do ciclo de vida (Wallménus, Pettersson, Jaenson & Nilsson, 2012) ou por *cofeeding* (Levin *et al.*, 2012).

A área do Mediterrâneo é altamente endémica (Alexandre *et al.*, 2011; Socolovschi *et al.*, 2012), verificando-se, nos últimos 10 anos, um aumento significativo da sua prevalência em Portugal e Itália (de Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003; Rovero *et al.*, 2008, Duque *et al.*, 2012). O vetor *R. sanguineus* é o principal vetor e reservatório de *R. conorii* (Silva *et al.*, 2006; Renvoisé & Raoult, 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2010), sendo, os cães, os principais hospedeiros do ciclo de vida desta espécie de ixodídeos, em Portugal (Caeiro, 1992, citado por Alexandre *et al.*, 2011).

Após entrada na circulação sanguínea do hospedeiro, *R. conorii* invade o núcleo das células endoteliais (Renvoisé & Raoult, 2009) existentes nas arteríolas e vénulas, provocando lesão nestes vasos (Greene *et al.*, 2006) e podendo as referidas células, aglomerar-se ou não (Renvoisé & Raoult, 2009). Ocorre posterior replicação e dispersão por via linfática ou sanguínea, provocando uma vasculite, com aumento da permeabilidade microvascular (Gong *et al.*, 2012) e acumulação de fluidos nos tecidos (Greene *et al.*, 2006; Renvoisé & Raoult, 2009). A infeção é, normalmente, subclínica (Schicht, Schnieder & Strube, 2012), podendo ocorrer doença, principalmente na fase aguda, causando sinais de febre, linfadenopatia, mucosas pálidas, anorexia, petéquias e gastrointestinais. A alteração laboratorial mais frequente é trombocitopenia, seguindo-se a leucopenia (Alexandre *et al.*, 2011). A deteção de anticorpos anti-*R. conorii* no soro de animal infetado pode ser feita pela técnica IFI (Keysary & Strenger, 1997; Greene *et al.*, 2006), PCR, WB, ELISA, imunodeteção em biópsias e cultura em células (Greene *et al.*, 2006).

O tratamento pode ser efetuado por doxiciclina (Raoult & Drancourt, 1991; Greene *et al.*, 2006), 2006). Profilaticamente, devem ser controlados os vetores quer no cão, quer no ambiente (Greene *et al.*, 2006).

A MSF é uma doença de declaração obrigatória, sendo, provavelmente, em Portugal, a hemoparasitose mais importante (de Sousa *et al.*, 2003), com uma incidência de 9,8/10<sup>5</sup> habitantes (Silva *et al.*, 2006). Nos casos graves, a MSF pode causar, encefalite e lesões cerebrais, no Homem (Duque *et al.*, 2012).

#### **1.2.4. *Mycoplasma haemocanis***

*Mycoplasma haemocanis* era antigamente designado por *Haemobartonella canis*, tendo sido reclassificado (Messick, Walker, Raphael, Berent & Shi, 2002; Bowman *et al.* 2009; do Nascimento, Santos, Guimaraes, SanMiguel & Messick, 2012). É uma bactéria pleomórfica, com aproximadamente 0,3 a 0,8 µm de tamanho, que adere à superfície dos eritrócitos (Chalker, 2005), podendo ser observada isolada ou em cadeias, apresentando formas cocóides ou em anel, no sangue periférico do hospedeiro (Bowman *et al.*, 2009; do Nascimento *et al.*, 2012).

*M. haemocanis* é transmitido por *R. sanguineus* (Messick, 2003; Hamel *et al.*, 2013), suspeitando-se da possibilidade de infeção por outras espécies de ixodídeos (Crawford *et al.*, 2013). Pensa-se que poderá, ainda, ser transmitido por via transplacentária, por transfusão sanguínea ou por ingestão (Compton, Maggi & Breitschwerdt, 2012; Pitorri *et al.*, 2012; Crawford *et al.*, 2013).

Tem distribuição mundial, especialmente em áreas onde a prevalência de *R. sanguineus* é elevada, nomeadamente na Europa, EUA e Canadá, com prevalências que variam de 0,5% a 40% (Chaker, 2005; do Nascimento *et al.*, 2012).

A maioria das infeções por *M. haemocanis* em cães é crónica e assintomática, agudizando-se esporadicamente, com sinais de anemia severa, perda de peso, letargia, febre e anorexia, normalmente em animais imunocomprometidos ou esplenectomizados (Chalker, 2005; do Nascimento *et al.*, 2012; Pitorri *et al.*, 2012). O diagnóstico pode ser efectuado por observação microscópica de sangue periférico (pouco sensível) ou pela técnica PCR, muito mais sensível (Pitorri *et al.*, 2012). O tratamento pode ser efetuado por doxiciclina, devendo ser administrada prednisolona, para limitar a hemólise e fagocitose dos eritrócitos (Messick, 2003; Pitorri *et al.*, 2012). O controlo do vetor no animal e no ambiente é a forma mais eficaz de profilaxia.

## **2. Parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas**

Existem vários nemátodes que afectam os aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas dos cães, como os metastrongilídeos *Angiostrongylus vasorum* e *Crenosoma vulpis*, os filarídeos *Dirofilaria* spp. e o tricurídeo *Eucoleus aerophilus* (*Capillaria aerophila*). De seguida, descrevem-se apenas *D. immitis* e *A. vasorum* pela sua maior importância veterinária e faz-se referência ao filarídeo *Acanthocheilonema reconditum*, pela frequente confusão aquando do diagnóstico de *D. immitis*.



## 2.1. *Dirofilaria immitis*

*Dirofilaria immitis* é, em Portugal, o agente causador da dirofilariose canina (Cardoso *et al.*, 2012). Os parasitas adultos são longos e delgados, com cerca de 12 a 20 cm de comprimento no macho e 25 a 31 cm de comprimento na fêmea (Bowman *et al.*, 2009), localizando-se no ventrículo direito, artéria pulmonar e veia cava posterior. O macho tem uma típica cauda espiral frouxa e as microfilárias são encontradas no sangue, apresentando 302 µm de comprimento e 6 µm de largura, uma zona frontal cónica e a posterior retilínea (Magnis *et al.*, 2013).

O ciclo biológico da *D. Immitis* inicia-se com a ingestão de microfilárias (larvas L<sub>1</sub>), por mosquitos (hospedeiros intermédios) dos géneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Cardoso *et al.*, 2012), aquando da sua alimentação num hospedeiro infectado. Após entrar no mosquito, a L<sub>1</sub> sofre duas mudas no vetor até L<sub>3</sub> (estadio infectante), que é posteriormente introduzida no hospedeiro definitivo. Cerca de 3 dias depois, as L<sub>3</sub> passam para L<sub>4</sub> e 2 a 3 meses depois, para adultos, alojando-se no coração e artérias pulmonares, podendo sobreviver durante 7 anos ou mesmo mais (González-Miguel, Morchón, Carretón, Montoya-Alonso & Simón, 2013). Ao fim de 6 meses pós-infeção, as fêmeas adultas fertilizadas, libertam microfilárias (Urquhart *et al.*, 1996; Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009).

A dirofilariose causada por *D. immitis* apresenta uma distribuição cosmopolita (González-Miguel *et al.*, 2013), podendo afetar o cão e outros mamíferos, como furões (*Mustela putorius*), gatos (*Felis catus*), cavalos (*Equus caballus*) e castores (*Castor canadensis*), apesar de, nestes últimos, a microfilariemia ser rara (Lee *et al.*, 2010). Contudo, a raposa (*Vulpes vulpes*), deve ser considerada um importante reservatório, por suportar as formas larvares de *D. immitis* (Magi *et al.*, 2008), assim como os coiotes (*Canis latrans*) e lobos (*Canis lupus*) (Lee *et al.*, 2010). Na Europa, a actividade dos culicídeos encontra-se limitada ao período que decorre entre a Primavera e o Verão (Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012), devido às ótimas condições de temperatura, precipitação e humidade relativa (Monteiro, de Souza & de Albuquerque, 2007; Mortarino *et al.*, 2008; Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi & Cringoli, 2009). No entanto, estão a reunir-se condições para a sua disseminação para novas áreas até então indemnes (Morchón *et al.*, 2012), sendo este processo facilitado quer pelo aquecimento global (Genchi *et al.*, 2009), quer pela resistência progressiva aos insecticidas (Knots & Takken, 2007), presença e movimentação de reservatórios microfilarémicos e aumento do número de animais que viajam em férias ou por comércio de animais de áreas endémicas (Morchón *et al.*, 2012). Ademais, têm sido identificados novos vetores competentes, como o mosquito *Aedes albopictus* que, pode, futuramente, alastrar a doença de norte a sul da Europa (Genchi *et al.*, 2009). Em Portugal, tem sido detetado *D. immitis* com prevalências de 16,7% no Ribatejo (Araújo, 1996, citado por Morchón *et al.*, 2012) e recentemente de 15,1% na região Centro de Portugal (Alho *et al.*, 2013).

A fisiopatologia da infeção por *D. immitis* deve-se sobretudo à presença de parasitas adultos nas artérias pulmonares, de microfilárias em circulação e à libertação da bactéria endossimbiótica *Wolbachia pipientis* aquando da morte de ambas as formas (adultos e microfilárias) (Carretón *et al.*, 2013). A presença de formas adultas de *D. immitis* causa doença vascular crónica associada a reações inflamatórias, com proliferação na íntima e espessamento da parede dos vasos e ainda, obstrução do fluxo sanguíneo por diminuição do lúmen da artéria pulmonar e arteríolas. A fase aguda

da dirofilariose verifica-se quando ocorre a morte simultânea de vários parasitas adultos, provocando a exacerbação das reações inflamatórias e havendo risco acentuado de tromboembolismo, com risco imediato para a vida do hospedeiro (Bowman *et al.*, 2009; González-Miguel *et al.*, 2013; Carretón *et al.*, 2013). No período pré-patente ou em infecções com uma reduzida carga de parasitas, os cães podem ser assintomáticos. No entanto, em infecções crônicas e com maior carga parasitária, pode haver oclusão, inflamação arterial e hipertensão pulmonar, observando-se sinais de tosse, dispneia, hemoptise e nos casos graves, insuficiência respiratória e insuficiência cardíaca congestiva (Nelson & Couto, 2001; Lee *et al.*, 2010; Carretón *et al.*, 2013). Para o diagnóstico podem ser usados testes serológicos com antígenos da forma adulta de *D. immitis*, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), testes de hemaglutinação e ensaio imunocromático. Contudo, a maioria dos testes comerciais não detecta infecções com menos de 5 meses, nem parasitas machos (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009). Pode ser utilizada a técnica de Knott modificada para a deteção de microfilárias, devendo, contudo, ser efetuado o diagnóstico diferencial com outras microfilariemias, como as provocadas por *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum*, *A. dracunculoides* e *Brugia* spp. (Rani, Irwin, Gatne, Coleman, McInnes & Traub, 2010). *D. repens*, *A. dracunculoides* *Brugia* spp. não são prevalentes em Portugal e a maioria das infecções de *Acanthocheilonema* spp. não tem significado clínico (Irwin & Jefferies, 2004). Pode, ainda, ser utilizado um teste comercial de atividade de fosfatase ácida, o qual evidencia os poros excretor e anal nas microfilárias de *D. immitis* (Magnis *et al.*, 2013). O ecocardiograma é um exame complementar frequentemente utilizado para a deteção e quantificação das formas adultas (Carretón *et al.*, 2013).

O tratamento a instituir deve basear-se no grau de gravidade da doença, sendo o tromboembolismo pulmonar uma consequência inevitável do sucesso da terapia adulticida (Carretón *et al.*, 2013), recomendando-se muitas vezes a remoção cirúrgica dos parasitas adultos (Nelson & Couto, 2001). Pode ser efetuado terapêutica adulticida com tiacetarsamina ou melarsomina e, terapêutica microfilaricida com ditiazanina, ivermectina ou milbemicina oxima (Nelson & Couto, 2001; Andrade, 2002; Bowman *et al.*, 2009; Carretón *et al.*, 2013). Deve ainda, haver restrição de exercício físico em determinadas fases do tratamento (Carretón *et al.*, 2013). Profilaticamente, pode ser administrada dietilcarbamazina, ivermectina ou milbemicina (Andrade, 2002).

A exposição a larvas infectantes de *D. immitis* em humanos, é mais frequente do que se pensa (Theis, 2005), contudo, a infeção ocorre raramente e, tipicamente, não é associada a sinais clínicos severos. Em humanos, *D. immitis* não atinge a maturidade, pelo que apenas os parasitas pré-adultos (larvas) são responsáveis pela dirofilariose pulmonar, morrendo e formando granulomas semelhantes a nódulos cancerígenos (Simón, Morchón, González-Miguel, Marcos-Axutegi & Siles-Lucas, 2009). As larvas foram ainda, observadas em localizações incomuns, como cérebro, olhos e testículos (Lee *et al.*, 2010).

## **2.2. *Angiostrongylus vasorum***

*Angiostrongylus vasorum* é um nemátode metastrongiloide causador da angiostrongilose canina. As formas adultas têm aproximadamente 13-21 mm (Gredal *et al.*, 2011), localizando-se no coração direito e artérias pulmonares dos cães e raposas (Morgan & Shaw, 2010). As formas larvares L<sub>1</sub>

apresentam cerca de 310 a 399 µm de comprimento e possuem um botão cefálico anterior e uma cauda em forma de S com uma espinha dorsal (Ballweber, 2012). O ciclo de vida é indirecto (Ballweber, 2012), havendo a formação de ovos a partir do macho e fêmea adultos (Morgan & Shaw, 2010), dando, posteriormente, origem às L<sub>1</sub>, que são transportadas para a rede capilar pulmonar e penetram nos alvéolos, onde são, posteriormente, arrastadas para a faringe e deglutidas, sendo, posteriormente eliminadas pelas fezes. As L<sub>1</sub> desenvolvem-se até L<sub>3</sub> (estadio infectante), durante um período de 16 a 18 dias (Ballweber, 2012), num hospedeiro intermediário, como um molusco gastrópode (lesma ou caracol) (Barçante *et al.*, 2003; Morgan & Shaw, 2010), ou a rã, podendo esta, ser também, um hospedeiro paraténico ou de transporte (Ballweber, 2012). O número de hospedeiros intermediários pode ser amplo, considerando-se várias espécies de gastrópodes (Ferdushy, Kapel, Webster, Al-Sabi & Grønvold, 2009). O hospedeiro definitivo é infectado ao ingerir o gastrópode por predação, por ingestão inadvertida ao lamber ou mastigar (Barçante, Barçante, Dias & Lima, 2003; Morgan & Shaw, 2010), ou por ingestão de larvas livres no ambiente (Morgan & Shaw, 2010). Após a ingestão, as L<sub>3</sub> penetram na parede do sistema gastrointestinal e migram para os linfonodos viscerais, onde se desenvolvem em nemátodos adultos imaturos (Ballweber, 2012). Seguidamente, migram por via sanguínea ou linfática para o coração ou artérias, onde amadurecem (Morgan & Shaw, 2010).

A angiostrongilose pulmonar já foi identificada na Europa (Pissarra, Santos, Gomes & Madeira de Carvalho, 2006; Papazahariadou *et al.*, 2007; Madeira de Carvalho, Pereira da Fonseca, Gomes & Meireles, 2009; Denk *et al.*, 2009; Kock & Willesen, 2009; Tieri *et al.*, 2011; Lepri *et al.*, 2011; Gallagher, Brennan, Zarelli & Mooney, 2012), em todo o continente Americano (Lima, Guimaraes & Lemos, 1994; Conboy G., 2004; Oliveira-Júnior, Barçante, Barçante, Ribeiro & Lima, 2004) e no Uganda (Bwangamoi, 1972; Bwangamoi, 1974). A prevalência é maior em animais jovens (Gredal *et al.*, 2011; Ballweber, 2012; Al-Sabi *et al.*, 2013). Os reservatórios incluem outros canídeos, como a raposa vermelha, o lobo, o coio e o chacal (Ballweber, 2012). Contudo, na Europa, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) é o único hospedeiro definitivo selvagem (Saeed, Maddox-Hyttel, Monrad & Kapel, 2006). Estudos recentes de Magi, Guardone, Prati, Mignone & Macchioni (2014) no noroeste de Itália detectaram prevalências de 78,2% de infeção nesta espécie. Também estudos de Franssen *et al.*, (2014) na Dinamarca confirmam um significativo aumento de *A. vasorum* em raposas vermelhas nos últimos 35 anos. Pensa-se que o risco de infeção com *A. vasorum* encontra-se subestimado (Denk *et al.*, 2009).

A angiostrongilose é tipicamente assintomática ou associada a sinais leves e intermitentes nas fases iniciais de infeção (Bourque, Conboy, Miller & Whitney, 2008; Ballweber, 2012). Contudo, quando a carga parasitária é alta, causa, caracteristicamente, disfunção respiratória, podendo também causar hemorragias e alterações neurológicas, cardiovasculares e gastrointestinais, com ou sem disfunção respiratória (Bourque *et al.*, 2008; Morgan & Shaw, 2010; Lepri *et al.*, 2011; Gredal *et al.*, 2011). Os animais apresentam, frequentemente, sinais de tosse, intolerância ao exercício, dispneia, insuficiência cardíaca direita, e outros menos específicos como vômito, diarreia e anorexia (Kock & Willesen, 2009). Os parasitas, podem, ainda, ser encontrados noutras regiões e órgãos corporais, para além do coração e artérias pulmonares, como nos olhos, rins, cérebro, pâncreas e artéria femoral (Oliveira-Júnior *et al.*, 2004; Denk *et al.*, 2009; Conboy, 2011; Lepri *et al.*, 2011). As

alterações bioquímicas associadas são: trombocitopenia, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial activada prolongados, presença de produtos de degradação da fibrina, hiperglobulinemia, anemia e deficiência do fator V (Conboy, 2011; Kock & Willeesen, 2009).

O diagnóstico definitivo é efectuado pela detecção da L<sub>1</sub>, através da técnica de Baermann ou de esfregaços fecais directos (Ballweber, 2012), ou ainda, efectuando-se lavagens traqueais ou broncoalveolares (Denk *et al.*, 2009).

A terapêutica deve ser iniciada de imediato, mesmo sem o diagnóstico definitivo (Morgan & Shaw, 2010), administrando-se moxidectina (Schnyder *et al.*, 2009), milbemicina (Conboy, 2004), febendazol (Willeesen, Kristensen, Jensen, Heine & Koch, 2007) ou imidacloprid-moxidectina (Willeesen *et al.*, 2007; Ballweber, 2012). Pode ser necessário o tratamento de suporte, conforme a sintomatologia apresentada (Kock & Willeesen, 2009; Helm, Morgan, Jackson, Wotton & Bell, 2010). Profilaticamente, recomenda-se o uso de um anti-helmíntico mensalmente, nas regiões endémicas (Schnyder *et al.*, 2009; Conboy, 2011). Devem ainda, ser removidas, adequadamente, as fezes dos animais afectados, de modo a interromper-se o ciclo de vida e evitar a contaminação ambiental (Kock & Willeesen, 2009), assim como efectuar-se exames coprológicos de controlo (Ballweber, 2012).

### **2.3. *Acanthocheilonema reconditum***

*Acanthocheilonema reconditum* é um nemátodo do tecido conjuntivo com cerca de 32 mm (Bowman *et al.*, 2009), podendo encontrar-se na cavidade peritoneal e tecido adiposo (Magnis *et al.*, 2013). As microfilárias são facilmente confundidas com as de *D. immitis*, diferenciando-se por apresentarem um corpo mais fino, uma extremidade mais obtusa e um grande gancho cefálico (Bowman *et al.*, 2009), tendo 265 µm de comprimento e 5 µm de largura (Magnis *et al.*, 2013). Desenvolvem-se nas pulgas das espécies *Ctenocephalides felis*, *C. canis* e *Pulex irritans* e nos piolhos malófagos *Trichodectes canis* e *Heterodoxus spiniger*, até ao seu estadio infetante (Leite *et al.*, 2012). É normalmente assintomático (Bowman *et al.*, 2009), podendo, em algumas casos, provocar elevada eosinofilia e leucocitose (Leite *et al.*, 2012) e, ocasionalmente pode ser um agente zoonótico (Magnis *et al.*, 2013).

## **3. Parasitas do aparelho digestivo**

### **3.1. Nemátodes**

Esta classe caracteriza-se por apresentar forma cilíndrica, sendo mais afilada nas extremidades. Os ovos dos nemátodes diferem bastante de formato e casca e apresentam na sua maioria três camadas. Dentro desta classe, têm especial importância as superfamílias Ascaridoidea, Rhabditoidea, Strongyloidea e Trichuroidea (Urquhart *et al.*, 1996).

#### **3.1.1. *Toxocara canis***

*Toxocara canis* é o nemátode mais prevalente no cão (Schnieder, Laabs & Welz, 2011), pertencendo à superfamília Ascaridoidea, família Ascarididae, apresentando grandes dimensões, cor esbranquiçada e cutícula opaca com estrias transversais, três grandes lábios (Figura 12A) e um bulbo

esofágico glandular. Os adultos podem atingir 10 a 15 cm de comprimento (Bowman *et al.*, 2009). O macho apresenta um pequeno processo digitiforme na cauda (Figura 12B), que o diferencia de *Toxoscaris leonina*. O ovo mede cerca de 75-90 µm, sendo castanho-escuro e subglobular, apresentando casca espessa, escavações (Urquhart *et al.*, 1996) e o seu conteúdo ocupa praticamente todo o espaço interior (Campillo & Vázquez, 1999).

As fêmeas depositam os ovos sem segmentação, no intestino delgado que, por sua vez, são evacuados do hospedeiro em simultâneo com as fezes. Estes ovos, não embrionados e não infecciosos, podem desenvolver-se para larvas infecciosas (L<sub>3</sub>) num período de 3 semanas a vários meses, dependendo do tipo de solo e das condições ambientais como a temperatura e humidade (Overgaauw *et al.*, 2009; Overgaauw & van Knapen, 2013). À temperatura de 25 a 30 °C e humidade de 85 a 95%, o desenvolvimento das larvas infectantes nos ovos demora 9 a 15 dias (Schnieder *et al.*, 2011). Existem 4 formas de infeção (forma oral, também designada directa, forma pré-natal, transplacentária ou intrauterina, forma galatogénica e, ainda, por meio de hospedeiros paraténicos). Na forma oral, após a ingestão de ovos embrionados e eclosão no duodeno, as larvas penetram na mucosa intestinal e, posteriormente, invadem os vasos linfáticos, migrando para os linfonodos. Depois, migram para capilares venosos e chegam ao fígado, via circulação portal. Seguem a via veia cava, passando para o coração e atingindo os pulmões. Daqui, podem prosseguir por 2 vias distintas: migração por via traqueodigestiva (cães com menos de 3 meses) ou pela via circulatória (progressivamente a partir dos 3 meses de idade), sendo distribuídos pelos vários tecidos (músculo esquelético, rins, fígado e SNC), designando-se por *larva migrans* (Schnieder *et al.*, 2011). A via pré-natal, transplacentária ou intrauterina é a mais importante nos cachorros, decorrendo por infeção da mãe durante a prenhez ou reativação nesta, de larvas somáticas, provenientes de infeções anteriores, acometendo praticamente 100% dos cachorros (Schnieder *et al.*, 2011; Overgaauw & van Knapen, 2013). Nos fetos, as larvas migram, na sua maioria, para o fígado onde permanecem até ao nascimento. Apesar de menos importante, os cachorros também podem ser infetados por via galatogénica. De referir que, nas cadelas em período gestação ou lactação, pode haver imunossupressão, favorecendo a migração traqueal e o desenvolvimento intestinal de larvas recém adquiridas ou larvas somáticas (Schnieder *et al.*, 2011). Os cães também podem ser infetados por ingestão de hospedeiros paraténicos (como pássaros, roedores, coelhos, suínos, raposas e inclusive o Homem) que possuam larvas nos seus tecidos. Em alguns casos, pode inclusive, desenvolver-se diretamente infeções intestinais, sem a migração traqueal, provavelmente por já ter ocorrido a migração destas larvas no hospedeiro paraténico (Bowman *et al.*, 2009; Schnieder *et al.*, 2011). O período de pré-patência é de 28 a 35 dias nos cachorros, enquanto nos animais mais velhos é de 40 a 56 dias (Schnieder *et al.*, 2011)

*T.canis* é a espécie mais frequente e ubiqüitária na Europa, sendo predominante no cachorro (Barutzki & Schaper, 2011). A sua alta prevalência deve-se, sobretudo, à eficácia da transmissão pré-natal e à proliferabilidade das fêmeas, que podem libertar 200.000 ovos por dia, bastante resistentes às condições ambientais e a muitos desinfetantes (Campillo & Vázquez, 1999). A prevalência de *T. canis* é muito superior em cachorros e cães jovens até 6 meses de idade (Overgaauw & van Knapen, 2013). As raposas podem funcionar como reservatórios (Overgaauw & van Knapen, 2013).

A migração larvar pode causar danos tecidulares, podendo ocorrer uma enterite com fezes hemorrágicas devido à penetração de larvas na parede intestinal. No caso de infecção oral, as larvas que ficaram retidas nos capilares do fígado, encapsulam, formando o aspecto mosqueado e manchas esbranquiçadas características, enquanto, que, a migração somática nos pulmões pode provocar petéquias, conferindo ao pulmão um aspecto pontilhado e podendo provocar tosse e dispneia. Os ascarídeos podem provocar lesões no intestino, fígado e pulmão e pode ser verificada, nestes órgãos, infiltração de leucócitos, sobretudo eosinófilos, e, formação de granulomas. As larvas podem ainda, ser detetadas nos rins e fibras do músculo cardíaco (Schnieder *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos mais frequentes são: diarreia com muco, vômito, emagrecimento (por vezes mesmo caquexia), abdómen distendido (em forma de tambor, sensível à pressão normal), tosse e dispneia (Bowman *et al.*, 2009; Schnieder *et al.*, 2011). Nos cachorros pode haver frequentemente uma diminuição do número de glóbulos vermelhos, devido a hemorragias internas (Schnieder *et al.*, 2011). O parasitismo pode, ainda, tornar o animal mais susceptível a outros problemas de saúde (Khayatnouri & Garedaghi, 2012). No caso de infecções maciças de *T. canis*, pode haver obstrução e mesmo rutura do intestino (Schnieder *et al.*, 2011), ou ainda, do ducto biliar comum ou do ducto pancreático (Bowman *et al.*, 2009). Laboratorialmente verifica-se tipicamente eosinofilia, podendo ainda verificar-se alteração das enzimas hepáticas ALT e GLDH e, ainda, anemia nos cachorros (Schnieder *et al.*, 2011). O diagnóstico pode ser efetuado por técnicas coprológicas, como os métodos de flutuação, onde são identificados os ovos. Também pode ser efetuado o diagnóstico através da detecção de anticorpos no soro (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009; Overgaauw & van Knapen, 2013).

O tratamento pode ser efectuado com mebendazol, fenbendazol e uma combinação de febantel-pirantel-praziquantel (Miró, Mateo, Montoya, Vela & Calonge, 2007b). Pode ser administrado a milbemicina oxima em cachorros com mais de 4 semanas ou a piperazina, em cachorros com mais de 6 semanas de idade, assim como associação de febendazol ou ivermectina com pamoato de pirantel (Bowman *et al.*, 2009). Profilaticamente, as cadelas em gestação devem ser tratadas com febendazol, do dia 40 do período gestacional a 2 dias pós-parto (Overgaauw & van Knapen, 2013), e os cachorros desparasitados às 2, 4, 6 e 8 semanas de vida e, depois, mensalmente até aos 6 meses, evitando-se assim, a infecção através do leite e a contaminação dos solos, onde os ovos são muito resistentes. Devem ser realizado testes coprológicos periódicos.

A infecção do Homem pode ocorrer por ingestão de ovos embrionados (infetantes), diretamente do contato com animais de companhia, do contato com solos contaminados, de vegetais mal lavados ou de larvas contidas em músculos ou órgãos de carne mal cozinhada de hospedeiros paraténicos, como galinhas, ruminantes ou suínos (mais raro). O Homem também atua como hospedeiro paraténico, podendo as larvas sobreviver vários anos, enquistados nos tecidos (Larva Migrante Visceral, LMV) (Overgaauw & van Knapen, 2013). Na maioria dos casos, a infecção é assintomática, mas pode ocorrer uma forma grave da doença com envolvimento do sistema nervoso central e um possível envolvimento do olho (Larva Migrante Ocular, LMO) (Overgaauw, 1997; Overgaauw & van Knapen, 2013).

É necessária a ingestão de vários ovos e este facto, associado ao facto dos ovos de *T. canis* se fixarem facilmente ao pêlo (por perifericamente serem rugosos facilitando a aderência a estruturas como os pêlos), diminuem a hipótese de ingestão de ovos suficientes para provocar infeção, através do contacto direto do Homem com o cão (Wolfe & Wright, 2003; Overgaauw *et al.*, 2009).

### 3.1.2. *Toxascaris leonina*

*Toxascaris leonina* também pertence à família Ascarididae, distinguindo-se, macroscopicamente, de *T. canis*, por a cauda do macho se ir afilando gradualmente. A fêmea pode atingir 10 cm de comprimento. O ovo é ligeiramente ovóide, com cerca de 90 µm de comprimento e apresenta casca espessa e lisa, sendo, muitas vezes, confundido com o oocisto de *Cystoisospora canis*. Desenvolve-se de forma rápida e pode ser ingerido por um hospedeiro não definitivo, enclodindo e enquistando nos tecidos, permanecendo em hipobiose no estadio infectante, até ser ingerido (o ovo ou o hospedeiro não definitivo) pelo hospedeiro definitivo (Bowman *et al.*, 2009). Da mesma forma que em *T. canis*, os ovos podem sobreviver durante muito tempo no ambiente, desde que em condições ótimas (Beirumvand *et al.*, 2013). As larvas podem se desenvolver para a forma adulta no intestino, sem que ocorra a migração tecidual (Kim *et al.*, 2013) e o período pré-patente é de cerca de 11 semanas (Urquhart *et al.*, 1996).

*T. leonina* é menos patogénico que *T. canis*, por não possuir a forma de transmissão pré-natal (Kim *et al.*, 2013), ocorrendo apenas diarreia e vômitos (Bowman *et al.*, 2009). Tal como os demais nemátodes, o diagnóstico pode ser realizado através de testes de flutuação.

O tratamento pode ser efetuado pela administração de ivermectina, com uma eficácia de 98% (Khayatnouri & Garedaghi, 2012) ou outros fármacos como mebendazol, fenbendazol, tiabendazol, albendazol e combinação de febantel-pirantel-praziquantel.

Não tem importância zoonótica, no entanto as larvas têm potencial para provocar doença no Homem (Mikaeili *et al.*, 2013).

### 3.1.3. *Strongyloides stercoralis*

*Strongyloides stercoralis* pertence à superfamília Rhabditoidea, família Rhabditidae (Urquhart *et al.*, 1996). Macroscopicamente, apresenta forma capiliforme, delgada e comprimento de menos de 1 cm. Localiza-se, profundamente, nas criptas da mucosa do trato gastrointestinal, especialmente no intestino delgado (Bowman *et al.*, 2009). Microscopicamente, apresenta um longo esófago que pode chegar até um terço do seu comprimento corporal. Os ovos são ovais e de casca fina e pequena (Urquhart *et al.*, 1996). O género *Strongyloides* é o único que apresenta gerações parasitárias, alternadas com parasitas de vida livre. As fêmeas são os únicos indivíduos parasitas do intestino delgado, sendo os seus ovos obtidos por partenogénese (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009), sendo as larvas obtidas designadas homogónicas (Bowman *et al.*, 2009). Estas copulam e produzem larvas heterogónicas rhabditiformes, que posteriormente se desenvolvem em larvas infectantes filariformes (Bowman *et al.*, 2009) As L<sub>3</sub> tornam-se infectantes em condições de temperatura e

humidade adequadas, penetrando por via cutânea ou por ingestão. Posteriormente, migram por via sistema venoso, pulmões e traqueia, originando as fêmeas adultas no intestino (Urquhart *et al.*, 1996). As larvas infectantes podem, também, penetrar na parede intestinal (autoinfecção interna) ou penetrar na mucosa perianal (autoinfecção externa). O período pré-patente é de, aproximadamente, uma semana (Bowman *et al.*, 2009).

A estrogiloidíase é uma doença endêmica em áreas tropicais, sendo também frequente em populações indígenas nos Estados Unidos da América (Dreyer *et al.*, 1996).

*S. stercoralis* é normalmente subclínica e, nos casos sintomáticos pode ser observada diarreia moderada, broncopneumonia e perda de peso (Yang, Gebeyehu, Jung, Kwon & Kwak, 2013). Nas infecções maciças, as migrações larvares podem danificar os alvéolos capilares, provocando hemorragias petequiais e equimoses nos pulmões (Bowman *et al.*, 2009).

O diagnóstico pode ser efetuado por testes coprológicos, nomeadamente o teste de flutuação (conforme a pesquisa de outros nemátodes), observando-se ovos embrionados típicos (Bowman *et al.*, 2009). O tratamento de eleição é a ivermectina (Mansfield & Schad, 1992; Lindo, Atkins, Lee, Robinson & Bundy, 1996; Yang *et al.*, 2013).

A espécie *S. stercoralis* pode infectar Homem, sendo considerada, na maioria dos casos, assintomática. No entanto, provocar uma hiperinfecção e disseminação em doentes imunodeprimidos (Keiser & Nutman, 2004; Sudré, de Macedo, Peralta & Peralta, 2006; Krolewiecki *et al.*, 2013) ou se a pessoa estiver com corticoterapia (Sudré *et al.*, 2006), podendo ser fatal em alguns casos.

#### **3.1.4. *Ancylostoma caninum***

*Ancylostoma caninum* pertence à superfamília Strongyloidea, família Ancylostomatidae, sendo identificado macroscopicamente pelo tamanho, apresentando de 1 a 2 cm de comprimento e uma postura “em gancho” da extremidade anterior, característica da espécie. Microscopicamente, apresenta uma cápsula bucal grande e com 3 pares de dentes marginais. Os adultos têm coloração avermelhada (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009). As fêmeas maduras depositam cerca de 16.000 ovos por dia, sendo esta eliminação inversamente proporcional à carga parasitária. Os ovos têm 56-65 µm de comprimento e 37-43 µm de largura, sendo mais pequeno e com uma parede mais fina que *U. stenocephala* (Thiepont, Rochette & Van Parijs, 1979). Posteriormente à eliminação, se as condições de temperatura, humidade e oxigenação forem adequadas, desenvolvem-se até atingir a fase larvar L<sub>3</sub> (forma infetante), que é posteriormente ingerida ou penetra na pele do novo hospedeiro. Neste, desenvolve-se em L<sub>4</sub> nos brônquios e traqueia, sendo posteriormente deglutida com o muco bronquial, terminando o seu desenvolvimento no intestino delgado (Campillo & Vázquez, 1999). Os cachorros também podem ser infetados pela via transmamária (Bowman, Montgomery, Zajac, Eberhard & Kazacos, 2010). O período pré-patente é de 16 dias (Dias *et al.*, 2013).

A ancilostomose é uma doença amplamente disseminada (Ashraf, Rafique, Hashmi, Maqbool & Chaudhary, 2008), encontrando-se, nas zonas endêmicas, em cachorros, sendo, no entanto, mais prevalente em animais com mais de 1 ano de idade (Martínez-Moreno *et al.*, 2007; Ashraf *et al.*, 2008; Barutzki & Schaper, 2011).



As formas pré-adultas escavam profundamente, destruindo a mucosa intestinal, podendo provocar anemia, diarreia, enterite hemorrágica, vômito, perda de peso, depressão e aumento de neutrófilos circulantes (Bowman *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2013). Podem mesmo causar a morte em cães novos (Dias *et al.*, 2013). O diagnóstico de ovos nas fezes (nomeadamente pela técnica de flutuação) deve ser acompanhado de diagnóstico sintomatológico, pois que, muitas vezes, a sintomatologia surge antes da detecção de ovos e a observação de ovos não significa que o cão esteja doente (Urquhart *et al.*, 1996).

Para o tratamento, os benzimidazóis e o pirantel são muito eficazes (Ashraf *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2007b). Se a doença for grave recomenda-se a administração de ferro e dieta rica em proteínas e em cachorros muito novos poderá ser necessário, transfusão sanguínea (Urquhart *et al.*, 1996).

Já houve casos acidentais e experimentais de *A. caninum* no Homem, provocando, as larvas, uma erupção transitória (linear, tortuosa, eritematosa e intensamente pruriginosa), designada por *Larva Migrans Cutaneae* (LMC), não completando, contudo, o ciclo de vida (Bowman *et al.*, 2009; Magalhães & Mateus, 2012; Heukelbach *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013).

### **3.1.5. *Uncinaria stenocephala***

*Uncinaria stenocephala* pertence também à superfamília Strongyloidea, família Ancylostomatidae, diferenciando-se de *A. caninum* por o adulto apresentar cor branca acinzentada e ter um par de placas arredondadas em vez de dentes (Bowman *et al.*, 2009). Os ovos têm 63-80 µm de comprimento e 32-50 µm de largura (Thiepont *et al.* 1979), apresentando o embrião segmentado, em forma de mórula (Bowman *et al.*, 2009).

O ciclo de vida é semelhante ao de *A. caninum*, com a excepção que a via normal é a infeção oral sem migração pulmonar. O período patente é de 15 dias (Urquhart *et al.*, 1996). O desenvolvimento até L<sub>3</sub> é altamente dependente da temperatura, contudo, os ovos são muito resistentes ao frio (Bowman *et al.*, 2009; Bowman *et al.* 2010). Ocorre frequentemente em países frios (Bowman *et al.*, 2010), sendo, contudo muito comuns em áreas tropicais e temperadas (Menelaos & Smaragda, 2006). É o ancilostomídeo mais frequente na Europa (Postigo, Martinez & Guisantes, 2006).

*U. stenocephala* ingere menos sangue que *A. caninum* (Bowman *et al.*, 2009), sendo menos patogénico. Nas infecções maciças pode-se verificar diarreia com muco (Menelaos & Smaragda, 2006), anorexia e letargia (Urquhart *et al.*, 1996). O diagnóstico pode ser efetuado também pelo método de flutuação, ou por ELISA, dada a dificuldade de distinção dos ovos com os de *A. caninum* (Postigo *et al.*, 2006). O tratamento é semelhante aos demais nemátodes.

Tal como em *A. caninum*, o Homem pode infectar-se através da ingestão de larvas infectantes, ou através de penetração cutânea destas, provocando a *larva migrans cutaneae* (Menelaos & Smaragda, 2006; Postigo *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2010).

### 3.1.6. *Trichuris vulpis*

A espécie *Trichuris vulpis* pertence à superfamília Trichuroidea (Urquhart *et al.*, 1996). Os adultos são capilariformes em formato de “chicote”, com a parte anterior fina e capilar e a parte posterior robusta (Bowman *et al.*, 2009), apresentando aproximadamente de 4,5 a 7,5 cm de comprimento (Traversa, 2011). Os ovos apresentam 70-80 µm de comprimento e 30-50 µm de largura (Conboy *et al.*, 2009) e têm a forma de um “limão” com um característico opérculo em cada pólo (Bowman *et al.*, 2009).

Os ovos eliminados nas fezes não são infectantes e apresentam apenas uma célula (Bowman *et al.*, 2009; Traversa, 2011), que embriona no solo ao longo de 3 a 8 semanas (dependendo das condições de humidade e temperatura) (Traversa, 2011), formando uma larva de 1º estágio (no ovo), que só eclode quando ingerido por um hospedeiro adequado. Após infeção, todo o desenvolvimento ocorre no epitélio intestinal (Bowman *et al.*, 2009). O período pré-patente é de 8 a 12 semanas. Os ovos podem permanecer viáveis e infecciosos, no meio ambiente, durante anos.

Está amplamente distribuído, com elevada prevalência, quer em cães de canil, quer em domésticos ou em errantes. Pode, ainda, infectar canídeos selvagens como raposas. *T. vulpis* move-se por debaixo do epitélio, introduzindo, por sua vez, o estilete nos vasos sanguíneos, causando inflamação do cego e, por vezes do cólon (Traversa, 2011). Muitos cães não apresentam sinais clínicos, contudo podem apresentar diarreia do cego com hematoquésia, muco e tenesmo (Bowman *et al.*, 2009). Os danos causados por *T. vulpis* podem ser verificados antes mesmo de terminado o período pré-patente, podendo os sintomas ocorrer na ausência de ovos (Taylor, Coop & Will, 2007). A intermitência na libertação de ovos dificulta o diagnóstico coprológico, devendo ser repetidas as colheitas de fezes (Traversa, 2011).

Para o tratamento, pode ser utilizado o fenbendazol, a milbemicina oxima, o febantel e a moxidectina. Dado o ovo ser muito resistente, ocorre frequentemente, reinfeção, em ambientes contaminados (Bowman *et al.*, 2009), devendo, assim ser efectuada uma adequada limpeza do ambiente.

Ainda não está bem estabelecida a sua importância zoonótica, tendo sido, no entanto, identificados ovos em fezes humanas (Traversa, 2011).

## 3.2. Céstodes

A Classe Cestoda apresenta helmintes com corpo achatado sem canal digestivo e segmentado, onde cada segmento apresenta dois órgãos reprodutores, masculino e feminino. Esta classe é composta por 2 ordens: Cyclophyllidea e Pseudophyllidea, sendo que na primeira, estão incluídos os principais céstodes com importância nos cães (famílias Taeniidae e Dipylidiidae).

### 3.2.1. Família Taeniidae

As ténias adultas medem desde dezenas a centenas de centímetros, apresentando um escólex com 4 ventosas e um rostro não retráctil, com 2 fileiras de ganchos. Os segmentos são retangulares e apresentam poros genitais unilaterais alternados. O género *Echinococcus* apresenta corpos muito pequenos, com apenas milímetros de comprimento, ao contrário género *Taenia* e, apenas, 4 ou 5 segmentos. No género *Echinococcus* as espécies encontradas em canídeos são *Echinococcus*

*granulosus* e *E. multilocularis*, enquanto no género *Taenia*, são encontradas as espécies *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia multiceps*, *Taenia serialis*, *Taenia pisiformis* (Bowman *et al.*, 2009).

Os segmentos são libertados pelo ânus e os ovos são expelidos para o exterior.. Se forem ingeridos por um hospedeiro intermediário adequado, os ovos eclodem e os embriões hexacantos penetram na parede intestinal, migrando para o fígado, peritoneu e músculos esqueléticos e cardíacos. É, nestes tecidos, que o embrião hexacanto cresce, diferenciando-se em L<sub>2</sub> (estadio infectante), formando uma vesícula com fluido (quisto hidático). Este quisto é, então, ingerido pelo hospedeiro definitivo (Bowman *et al.*, 2009).

As ténias raramente são patogénicas para os cães. O sinal mais comum é o prurido anal, por vezes com inflamação do saco anal. Muito raramente pode ocorrer obstrução intestinal em infecções maciças (Nelson & Couto, 2001). A larva de 2º estadio de *E. granulosus* forma o quisto hidático unilocular e é infectante para os cães e outros canídeos, enquanto a larva de 2º estadio de *E. multilocularis*, forma o quisto hidático alveolar e é infetante paracanídeos e felídeos domésticos e silvestres, com particular destaque para a raposa.

Os ovos de *Taenia* spp. e *Echinococcus* spp., podem ser identificados por técnicas de concentração por flutuação ou sedimentação, sendo, no entanto, indistinguíveis (Dalimi, Motamedi, Syavashi, Paykari & Hablolvarid, 2010; Beiromvand *et al.*, 2013). Pode-se observar directamente os segmentos em fezes frescas (Urquhart *et al.*, 1996; Nelson & Couto, 2001). A deteção de coproantígenos de *E. granulosus* pode ser efetuada por testes ELISA (Benito & Carmena, 2005; Dalimi *et al.*, 2010)

O tratamento é, maioritariamente, efetuado por praziquantel ou o epsiprantel (Nelson & Couto, 2001).

O Homem pode ser infectado por *Echinococcus granulosus* e *E. multilocularis* (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2012). Esta infeção pode decorrer no contacto directo com o cão ou por contaminação ambiental de fezes de cães (Benito & Carmena, 2005), sendo, no entanto, as crianças mais susceptíveis devido ao seu hábito de geofagia (Magalhães & Mateus, 2012).

### 3.2.2. *Dipylidium caninum*

*Dipylidium caninum* pertence à Família Dipylidiidae, sendo o céstodo mais comum no cão e no gato e, também, o mais pequeno, apresentando um comprimento que raramente é superior a 50-70 cm. O escólex tem um rostro retrátil com 4 ou 5 fileiras de ganchos pequenos. O proglote é alongado e possui dois conjuntos de órgãos genitais, com um poro que se abre em cada bordo lateral devido à duplicação genital (Urquhart *et al.*, 1996). O parasita adulto habita no intestino delgado do hospedeiro definitivo, enquanto a larva do tipo cistecercóide desenvolve-se na pulga (*Ctenocephalides canis*, *C. felis* e *Pulex irritans*) ou no piolho (*Trichodectes canis*), sendo que a infeção do hospedeiro definitivo ocorre por ingestão destes hospedeiros intermediários. No hospedeiro definitivo, o desenvolvimento do cistecercóide, até adulto, que liberta segmentos, demora cerca de 2 a 3 semanas (Bowman *et al.*, 2009).

*D. caninum* é muito comum, sendo a sua prevalência determinada pela prevalência do hospedeiro intermediário. É muitas vezes assintomático, podendo provocar apenas prurido no períneo e zona

perianal, principalmente se as glândulas anais estiverem repletas devido à obstrução dos seus canais de drenagem pelos proglotes do parasita (Urquhart *et al.*, 1996).

O diagnóstico é efetuado pelo confinamento dos ovos em proglotes com movimento próprio, além de detecção de cápsulas ovígeras pelos métodos de flutuação (Nelson & Couto, 2001). O tratamento pode ser efetuado por praziquantel ou por epsiprantel, tal como contra as ténias (Nelson & Couto, 2001), devendo-se controlar, simultaneamente, as pulgas e piolhos (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009), tanto no animal como na sua cama e locais habituais de repouso (Urquhart *et al.*, 1996).

A dipilidose é também uma zoonose, sendo as crianças mais susceptíveis devido aos piores hábitos de higiene e à maior exposição aos hospedeiros intermediários, podendo infectar-se com a ingestão destes (Bowman *et al.*, 2009; Szwaja, Romański & Zabczyk, 2011; Magalhães & Mateus, 2012).

### **3.3. Protozoários**

#### **3.3.1. *Cryptosporidium* spp.**

Os cães podem ser naturalmente infectados por *Cryptosporidium canis*, *C. parvum* e *C. meleagridis* (Fayer *et al.*, 2001; Hajdušek, Ditrich, Šlapeta, 2004). Estes agentes são causadores da criptosporidiose canina, sendo *C. canis* o mais frequentemente encontrado (Palmer *et al.*, 2008). *C. parvum* pode ser pesquisado no aparelho respiratório e intestinal de hospedeiros de várias espécies (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009). Os oocistos têm 4 a 6 µm de diâmetro, sendo eliminados em forma de oocistos (Nelson & Couto, 2001) e apresentando, cada um 4 esporozoítos (Bowman *et al.*, 2009).

O seu ciclo de vida é entérico, culminando na produção de oocistos de parede delgada e auto-infetantes e ainda, oocistos de parede espessa resistentes no meio ambiente (eliminados nas fezes) (Nelson & Couto, 2001). Os oocistos eliminados nas fezes, são ingeridos por outro hospedeiro e os esporozoítos invadem a bordadura em escova das microvilosidades dos enterócitos, diferenciando-se, rapidamente, formando esquizontes com 4 a 8 merozoítos. Após uma ou duas gerações de esquizontes, ocorre a gametogonia, com a produção de oocistos. Os esquizontes e gamontes desenvolvem-se num invólucro parasitóforo (possivelmente derivado das microvilosidades) (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009).

A presença ubiqüitária de oocistos no ambiente possibilita as diversas formas de transmissão. A enorme variedade de espécies afectadas e a presença de muitos portadores, são fatores epidemiológicos importantes, sendo que a patogenecidade varia com a espécie de *Cryptosporidium* e ainda, idade e estado imunitário do hospedeiro (Xiao, Fayer, Ryan & Upton, 2004).

É normalmente assintomática, mas pode causar diarreia severa, má absorção e perda de peso, causada por atrofia e fusão das vilosidades e inflamação (Irwin, 2002; Palmer *et al.*, 2008), ocorrendo com maior frequência em animais imunodeprimidos (Nelson & Couto, 2001).

O diagnóstico pode ser efetuado por flutuação em solução salina e exame microscópico, sendo, contudo, muitas vezes difícil, devido ao pequeno tamanho dos oocistos. Mais fiável é a técnica de centrifugação em solução de açúcar e observação microscópica dos oocistos. Pode ainda, ser executado o teste ELISA (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009), ou a técnica de coloração

Ziehl-Neelsen em esfregaços fecais, observando-se os esporozoítos que aparecem como grânulos vermelho-brilhantes. Pode-se ainda efectuar a técnica de imunofluorescência indirecta (Urquhart *et al.*, 1996).

O tratamento pode ser efectuado com paramomicina, azitromicina ou a tilosina (Bowman *et al.*, 2009). O nitazonixanide foi recentemente licenciado, nos EUA, para o tratamento da criptosporidiose em humanos (Rossignol, 2010). A forma mais eficiente de prevenção é evitar-se a exposição (Nelson & Couto, 2001).

O Homem pode ser infectado pelos oocistos eliminados pelas fezes, ocorrendo frequentemente entre várias pessoas e, raramente, entre o cão e o Homem. Também pode haver infeção por ingestão de água ou comida, contaminadas (Nelson & Couto, 2001; Dillingham, Lima & Guerrant, 2002). A infeção por *Cryptosporidium* spp. é uma causa comum de gastroenterite em pessoas (Griffiths, Theodos, Paris & Tzipori, 1998b), tendo uma importância maior nos doentes com o HIV (Palmer *et al.*, 2008).

### 3.3.2. *Giardia* spp.

*Giardia* spp. é um protozoário flagelado com aspeto piriforme, dois núcleos, oito flagelos e um disco de sucção ventral. Os cães são afetados por *G. canis*, que se encontra incluída no grupo de *G. duodenalis*, sendo esta designação, sinónimo de *G. lamblia* e *G. intestinalis* (Tangtronsup & Scorza, 2010). Os quistos eliminados nas fezes são multinucleados e apresentam flagelos visíveis (Urquhart *et al.*, 1996).

*Giardia* spp. apresenta um ciclo directo, sendo a forma parasitária, o trofozoíto (de 12-17 µm x 7-10 µm). Divide-se por fissão binária na mucosa intestinal (Campillo & Vázquez, 1999). Um animal infectado elimina quistos multinucleados (Urquhart *et al.*, 1996) com dimensões de 9-13 µm x 7-9 µm e forma oval (Campillo & Vázquez, 1999), que quando ingeridos por um novo indivíduo, vão habitar o intestino delgado (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.*, 2009). No entanto, iniciam a enquistação previamente no estômago, terminando no intestino, por meio da acção do ácido carbónico e das proteases pancreáticas presentes na biliar. São, então, libertados os trofozoítos que, fixando-se na mucosa, iniciam uma nova replicação. Este ciclo tem uma duração de 4 a 5 dias (Campillo & Vázquez, 1999; Bowman *et al.*, 2009).

*Giardia* spp. tem uma distribuição mundial, sendo, no entanto, mais prevalente em países subdesenvolvidos (Miotti, Gilman, Ryder, & Yolken, 1986). O nível de infeção é proporcional ao estado higio-sanitário dos animais e, dado que a transmissão ocorre pela via oral, deve-se ter em atenção possíveis contaminações de fontes hídricas, alimentos e ambiente. As fêmeas em gestação e em lactação, sujeitas a hormonas imunossupressoras, são uma importante fonte para os cachorros e os roedores também podem constituir uma fonte de infeção, devido à pouca especificidade de *Giardia* spp. As moscas, mosquitos e baratas são veículos de formas infectantes. Os quistos são muito pouco resistentes à dessecção, mas com boas condições de temperatura e humidade podem subsistir mais de 2 meses no ambiente (Campillo & Vázquez, 1999).

*Giardia* spp. pode provocar uma deficiente absorção intestinal, causada pela atrofia e encurtamento das microvilosidades, redução da atividade enzimática e perda da função da barreira epitelial,

aumento da permeabilidade e apoptose dos enterócitos (Palmer *et al.*, 2008). A maioria das infecções por *Giardia* spp. são assintomáticas, no entanto algumas podem levar a diarreia aguda ou crónica, perda de peso ou pouco ganho de peso, mesmo com o apetite normal. Menos frequentemente ocorrem sinais de vômito e letargia (Anderson *et al.*, 2004). *Giardia* spp. tem, também, uma acção vetorial importante, pois é capaz de veicular outros agentes patogénicos (Campillo & Vázquez, 1999).

O diagnóstico pode ser efectuado em fezes frescas, observando-se os trofozoítos. Pode ser efectuado pela observação de quistos por técnicas de flutuação ou pela técnica de Ziehl-Neelsen (Bowman *et al.*, 2009). Pode-se, ainda centrifugar o material de flutuação e utilizar soluções de sulfato de zinco para observação dos quistos. Existem, ainda, ao dispor, testes ELISA e IFA, de pesquisa de antígenos. Para a colheita de amostras devem ser efectuados 3 exames de fezes num período compreendido de 7 a 10 dias, ou então pode ser colhido material por meio de lavagens duodenais com solução salina, colhendo 5-10 ml (Nelson & Couto, 2001).

O tratamento pode ser efetuado por metronidazol, ou em alternativa, a associação de febantel, pamoato de pirantel e praziquantel durante 3 dias consecutivos (Nelson & Couto, 2001). A terapêutica pode, ainda, ser dificultada em animais com doenças concomitantes ou imunodeprimidos. Profilaticamente, deve-se desinfectar os locais habitados frequentemente pelo animal, com compostos de amónio ou alcatrão de pinho (Nelson & Couto, 2001) e soluções de fenol, água a ferver ou outros métodos físicos como o ozono ou, ainda, radiações ultra-violetas. (Campillo & Vázquez, 1999). Os alimentos devem ser bem lavados e deverá ser assegurado um acesso controlado de água aos animais.

Estima-se que em todo o mundo, 200 milhões de pessoas se encontram infectadas com *Giardia* spp., causando, sobretudo, diarreia crónica (Samn, Samn & El-Nour, 2012). Um estudo de Júlio *et al.* (2012), realizado no Distrito de Lisboa, revelou que 6,8% das crianças assintomáticas apresentavam-se positivas a *G. duodenalis*, sendo a proximidade de animais domésticos um fator de risco. O cão pode funcionar como reservatório da doença para o ser humano (Urquhart *et al.*, 1996). Tal como na infeção por *Cryptosporidium* spp., também *Giardia* spp., causa gastroenterite em pessoas (Griffiths, Balakrishnan, Widmer & Tzipori, 1998a), podendo também ser utilizado o nitazonixanide, recentemente licenciado nos E.U.A. (Rossignol, 2010).

## **4. Ectoparasitas**

### **4.1. Ácaros**

Os ácaros pertencem à ordem Acarina, sendo o grupo de ectoparasitas com maior responsabilidade nas dermatoses em cães. Fatores como a idade, condição corporal, raça e condições climáticas influenciam a infestação por ácaros (Rodríguez-Vivas, Ortega-Pacheco, Rosado-Aguilar & Bolio, 2003).

#### 4.1.1. *Demodex canis*

São conhecidos várias espécies de *Demodex* no cão, sendo *D. canis*, o mais comum agente de sarna demodécica canina (Ravera *et al.*, 2011). É um ácaro pequeno, com patas curtas e robustas (figura 15C) (Bowman *et al.*, 2009). Existe *Demodex* spp. de corpo curto e de corpo longo (Hillier & Desch, 2001). Em número reduzido, *D. canis* é um habitante comum da pele do cão, nomeadamente nos folículos pilosos e glândulas sebáceas, contudo, na maioria das vezes provoca dermatose (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003; Chee *et al.*, 2008; Fondati *et al.*, 2009; Ravera *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011; Mosallanejad, Alborzi & Katvandi, 2011).

A demodicose canina pode ser localizada ou generalizada (Chee *et al.*, 2008). Alguns dos fatores mais importantes que predispõem ao desenvolvimento de demodicose generalizada incluem o estatuto imunitário do animal, a raça (Medleau & Hnilica, 2003; Mueller, 2004, Singh *et al.*, 2011), a linhagem e a idade (Ghubash, 2006). Também estão implicados outros fatores como genéticos, nutricionais, stress oxidativo (Dimri *et al.*, 2008), comprimento do pêlo, fase do ciclo éstrico, parto, endoparasitismo e presença de doenças debilitantes (Singh *et al.*, 2011).

A demodicose canina tem sido dividida em duas categorias: demodicose juvenil (localizada e generalizada) e no adulto. É considerada infeção generalizada se houver mais de 5 lesões localizadas, envolvendo dois ou mais membros ou havendo o envolvimento de toda a região do corpo (Ghubash, 2006). A demodicose iniciada em adulto afecta animais mais velhos, sem historial de demodicose juvenil, sendo, geralmente, secundária a doenças imunossupressivas e neoplasias (Mueller, 2004). Os sinais clínicos mais comuns de demodicose incluem alopecia, eritema, pápulas e dermatite pustular, comedões (Ghubash, 2006). Uma complicação muito frequente da demodicose canina generalizada é a foliculite e/ou furunculose bacteriana secundária, provavelmente devido a alterações da imunocompetência (Kuznetsova, Bettenay, Nikolaeva, Majzoub & Mueller, 2012).

A histopatologia cutânea não é normalmente realizada dada o fácil diagnóstico através de observação microscópica de raspagens profundas da pele. Ao microscópio ótico podem ser observados os parasitas adultos, ninfas, larvas e/ou ovos de *Demodex* spp. (Medleau & Hnilica, 2003).

O tratamento da demodicose localizada juvenil em fase inicial resolve-se espontaneamente em 90% dos casos, mas nos restantes 10%, evolui para doença generalizada e requer o tratamento médico (Ghubash, 2006). Cerca de 40 a 50% dos casos de demodicose juvenil generalizada resolve-se espontaneamente pelo que é razoável iniciar-se tratamento apenas com terapia adjuvante (Ghubash, 2006), como banhos semanais com shampoo que contenha peróxido de benzoílo (Medleau & Hnilica, 2003; Kuznetsova *et al.*, 2012), podendo utilizar-se semanalmente, uma combinação de moxidectina com imidaclopride, em “spot-on”, nos casos menos severos (Mueller, 2012), apesar do amitraz ser a única droga recomendada pela FDA, para a demodicose canina (Ghubash, 2006). Pode ainda, ser usado a ivermectina, a moxidectina ou milbemicina oxima, sendo esta última a mais segura (Mueller, 2012). Nos cães com pêlo médio e comprido, este deverá ser cortado curto (Medleau & Hnilica, 2003). São necessárias 6 a 12 semanas para que ocorra a resolução das lesões, devendo ser confirmado mensalmente através de raspagens cutâneas profundas, até que se verifiquem 3 raspagens negativas consecutivas (Ghubash, 2006). A cessação prematura do tratamento pode resultar em recaída e resistência dos ácaros. O tratamento da piodermatite consiste, normalmente,

em antibioterapia sistêmica e tópica (Kuznetsova *et al.*, 2012). Todos os cães com demodicose juvenil generalizada devem ser esterilizados, pois podem transmitir a doença à descendência (Ghubash, 2006) e, as fêmeas, podem predispor à reincidência, aquando o estro ou prenhez (Medleau & Hnilica, 2003).

#### **4.1.2. *Sarcoptes scabiei***

*Sarcoptes scabiei* é um ácaro arredondado, com diâmetro até 0,4 mm, patas curtas que se projectam pouco para além das margens do corpo, estrias transversais e escamas triangulares no dorso (figura 15A) (Urquhart *et al.*, 1996), sendo o agente causador da sarna sarcóptica canina, assim como de humanos, raposas, equinos, bovinos e outros (Bowman *et al.*, 2009). Alimenta-se dos fluidos dos tecidos lesionados, após produzir galerias ou túneis nas camadas superiores da epiderme. *S. scabiei* é altamente contagioso entre cães, sendo transmitido por contacto direto entre estes (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003).

A presença de *S. scabiei* na pele leva a um intenso prurido, seguindo-se de pápulas eritematosas, com crostas, seborreia, alopecia e ainda, escoriações secundárias a auto-traumatismo (Bornstein, Frössling, Näslund, Zakrisson & Mörner, 2006), principalmente nos cotovelos, jarretes, pavilhão auricular e na zona ventral do peito (Ghubash, 2006). Muitas vezes é observado um reflexo pavilhão auricular – membros (Mueller, Bettenay & Shipstone, 2001).

O diagnóstico definitivo é realizado por identificação do ácaro à observação microscópica, apesar de se observar o parasita em apenas 25% das raspagens, uma vez que é necessário apenas um número reduzido de ácaros, para que ocorra o intenso prurido (Ghubash, 2006). *S. scabiei* pode ser diagnosticado, também pelo teste ELISA, apresentando boa sensibilidade (84,2%) e especificidade (89,5%) (Lower, Medleau & Hnilica, 2001).

O tratamento pode ser efetuado pela selamectina, ivermectina (Six *et al.*, 2000; Ghubash, 2006), milbemicina (Miller *et al.*, 1996), fipronil (spray) (Curtis, 1996), mergulhos em enxofre cálcico (Ghubash, 2006) ou amitraz, quando os restantes tratamentos falham (Scott, Miller & Griffin, 2001). Um tratamento curto de corticosteróides orais é apropriado como terapia adjuvante, de forma a controlar o prurido (Ghubash, 2006). Todos os animais que estejam em contacto com o animal afectado devem ser tratados, independentemente de apresentarem sinais clínicos ou não (Sosna & Medleau, 1992; Urquhart *et al.*, 1996; Ghubash, 2006). É recomendado ainda, a lavagem ou destruição da cama do animal, porque todos os estadios de *S. scabiei* podem sobreviver no meio ambiente (Sosna & Medleau, 1992).

*S. scabei* pode infestar facilmente o Homem, sendo as crianças e as pessoas imunodeprimidas mais frequentemente afetados e apresentando sinais clínicos mais graves (Currier, Walton & Currie, 2012).

#### **4.1.3. *Octodectes cynotis***

*Octodectes cynotis* é um ácaro que habita a superfície da pele e os canais auditivos, sendo causador da sarna otodéctica (Medleau & Hnilica, 2003). Assemelha-se ao *Psoroptes* e ao *Chorioptes* na sua



conformação geral, sendo oval e com patas salientes, mas diferencia-se pelos apódemas fechados adjacentes ao primeiro e segundo pares de patas. *O. cynotis* nutre-se superficialmente e, o seu ciclo completo demora 3 semanas (Urquhart *et al.*, 1996). Pode infestar uma variedade de hospedeiros, incluindo raposas selvagens do ártico. Os furões podem ser reservatórios (Gunnarsson, Hersteinsson & Adalsteinsson, 1991).

*O. cynotis* causa otites externas, caracterizadas por um cerúmen espesso exsudativo e cor acastanhada a preta, com sinais de irritação, prurido, alopecia e balanceamento da cabeça (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003; Ghubash, 2006; Chee *et al.*, 2008), afetando o pescoço, os glúteos e, em alguns casos, a cauda (Medleau & Hnilica, 2003).

O diagnóstico é efetuado pela observação dos ácaros (partículas esbranquiçadas móveis) com um otoscópio, no canal auditivo ou pela observação microscópica dos ácaros colhidos juntamente com os detritos e corrimento auricular (Rosychuk, 1994; Urquhart *et al.*, 1996). Se houver uma inflamação auricular e infeção secundária por bactérias ou leveduras, os ácaros podem deixar os canais auditivos e infestar outras partes do corpo do animal (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003).

O tratamento pode ser efetuado com selamectina (Six *et al.*, 2000) ou ivermectina injectável e gentamicina-clotrimazol-dexametasona, aplicado no conduto auditivo (Medleau & Hnilica, 2003). Contudo, a terapêutica auricular tem como desvantagem o facto do tratamento ser prolongado e possibilitar a reinfestação a partir do ambiente (Ghubash, 2006). É recomendada, a limpeza de ouvidos previamente à aplicação do tratamento (Rosychuk, 1994) e, a aplicação simultânea de um insecticida tópico no resto do corpo do animal e ainda, o tratamento de animais que estão em contacto com o doente (Urquhart *et al.*, 1996).

*O. cynotis* pode parasitar o Homem, provocando uma dermatite transitória (Herwick, 1978) ou, pode invadir o canal auditório externo, causando uma irritação intensa (Lopez, 1993; Urquhart *et al.*, 1996).

#### **4.1.4. *Cheyletiella yasguri***

*Cheyletiella yasguri* é o ácaro causador da cheyletielose canina. Este parasita é facilmente reconhecido ao microscópio ótico por ser muito largo (Ghubash, 2006) e por ter uns ganchos bucais enormes (Bowman *et al.*, 2009). Tanto as larvas, como as ninfas e os adultos são parasitas (Medleau & Hnilica, 2003), sendo altamente contagiosos (Ghubash, 2006). *O. cynotis* habita na pelagem, invadindo a pele apenas para se alimentar (Medleau & Hnilica, 2003), podendo viver fora de um hospedeiro por um período até 10 dias (Ghubash, 2006). Os coelhos e os gatos também podem ficar doentes ou podem ser portadores assintomáticos (Medleau & Hnilica, 2003; Ghubash, 2006).

Os animais infestados apresentam “caspa” que se movimenta no dorso devido às movimentações deste grande ácaro (Bowman *et al.*, 2009). Os sinais clínicos incluem prurido, pápulas, lesões crustais e descamação seca (Ghubash, 2006). A pelagem apresenta-se com uma aparência farinácea, em especial na linha média dorsal (Medleau & Hnilica, 2003). Apesar de alguns indivíduos serem assintomáticos, continuam a ser um foco de infeção directo para outros animais e para o meio ambiente (Ghubash, 2006).

O diagnóstico pode ser efectuado por escovagem da caspa para papel preto e observação do movimento dos ácaros, sendo, no entanto, muitas vezes difíceis de observar. Pode ser efectuado a detecção dos ácaros, ninfas, larvas ou ovos através de microscopia ótica, utilizando-se o raspado de pele superficial ou fita adesiva (Medleau & Hnilica, 2003; Ghubash, 2006).

O tratamento pode ser efectuado com aplicações tópicas de imidaclopride/moxidectina (Loft & Willesen, 2007), selamectina (Mueller & Bettenay, 2002), milbemicina (White, Rosychuk, & Fieseler, 2001), permetrina 65% (Endris, Reuter, Nelson, & Nelson, 2000), fipronil (Chadwick, 1997), enxofre cálcico ou banhos de amitraz (Ghubash, 2006). Para evitar reinfestação, torna-se necessário o tratamento de todos os animais que estão em contacto com o doente e, ainda, deve ser efectuada uma adequada desinfestação dos materiais em contacto com o animal doente.

O Homem pode ser hospedeiro accidental ou transitório (Bowman *et al.*, 2009).

#### **4.2. Ixodídeos**

Os ixodídeos, vulgo “carraças”, são artrópodes ectoparasitas hematófagos estritos, que parasitam uma ampla variedade de hospedeiros por todo o mundo (Silva *et al.*, 2006). Pertencem à subclasse Acari, ordem Parasitiformes, subordem Ixodida. São ectoparasitas hematófagos obrigatórios de animais domésticos e selvagens e, de Humanos, estando distribuídos por todo o mundo (de la Fuente *et al.*, 2006a). Na generalidade, o número de doenças transmitidas por carrasças tem aumentado significativamente nos últimos 30 anos. Os ixodídeos são muito sensíveis ao clima, tal como os outros artrópodes. A maior parte do seu ciclo de vida decorre no ambiente, sendo dependente de uma combinação complexa de variáveis climáticas e da presença de hospedeiros e vegetação (Estrada-Peña, Ayllón & de la Fuente, 2012). As alterações climáticas podem provocar mudanças nas relações entre os ixodídeos, hospedeiros e agentes patogénicos transmitidos pelos primeiros e, particularmente, a invasão de novas áreas e dispersão de doenças para novas regiões (Gray, Dautel, Estrada-Peña, Kahl & Lindgren, 2009). Por sua vez, pode limitar as doenças, por si transmitidas, em áreas que outrora apresentavam altas prevalências. Os ixodídeos apresentam três estadios de desenvolvimento (larvas, ninfas e adultos), cada um alimentando-se durante 3 a 10 dias no hospedeiro, até completar a engorgitação e cair ao solo. São muito sensíveis às perdas de água e muito influenciados pela temperatura e propriedades da cutícula (Estrada-Peña *et al.*, 2012), pelo que a sobrevivência é especialmente afectada durante o período de não parasitismo, ou seja, no período em que ficam mais sujeitas à influência do clima (Ogden *et al.*, 2004). Vários estudos sugerem uma ligação entre a resposta ao stress dos ixodídeos e o seu comportamento e transmissão de agentes patogénicos (Estrada-Peña *et al.*, 2012). Seguidamente, serão descritos abreviadamente as espécies *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e o *Ixodes ricinus*, dada a sua importância e especial relevância na transmissão de agentes patogénicos já referidos neste trabalho, assim como pela sua prevalência em Portugal.

#### 4.2.1. *Rhipicephalus sanguineus*

*Rhipicephalus sanguineus*, designado muitas vezes por “carraça” castanha do cão, apresenta a base do capítulo hexagonal, presença de olhos e festões e escudo não ornamentado (figura 16A) (Bowman *et al.*, 2009). É o ixodídeo mais prevalente em Portugal, existindo em todas as regiões do país (Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006; Cardoso *et al.*, 2012). É a espécie tipicamente representativa da fauna ixodídea Mediterrânea (Xhaxhiu *et al.*, 2011), sendo, também, a mais disseminada pelo mundo. Encontra-se adaptada a uma grande variedade de climas e hospedeiros vertebrados (Santos *et al.*, 2006). Pode infectar canídeos selvagens (Labruna *et al.*, 2005) e acidentalmente, o Homem, sendo responsável pela transmissão de vários agentes patogénicos ao cão, entre eles, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* (Dantas-Torres, 2008) e *Babesia canis* (Bowman *et al.*, 2009) e *R. rickettsi*, ao Homem (Dantas-Torres, 2010b). *R. sanguineus* apresenta uma evolução do tipo trifásico e ditrópico (Silva *et al.*, 2006) e, quando estritamente dependente do seu hospedeiro preferido (cão), é endofílica (adaptada a viver em espaços interiores) e monotrófica (todos os estádios de desenvolvimento alimentam-se das mesmas espécies de hospedeiros) (Silva *et al.*, 2006; Dantas-Torres, 2010b). Contudo cada estadio necessita de um hospedeiro novo para se alimentar (Dantas-Torres, 2010). Está melhor adaptada a temperaturas elevadas e não é exigente com a humidade relativa, pelo que, em Portugal a maior densidade populacional desta espécie ocorre nos meses de Julho e Agosto, apesar das formas adultas poderem ser encontradas durante todo o ano (Silva *et al.*, 2006). O período de alimentação de *R. sanguineus* pode variar de 2 dias (ex: larvas) a várias semanas (ex: fêmeas), dependendo do estadio de desenvolvimento e do hospedeiro. Os machos, por sua vez, podem obter refeições variadas, transitando rapidamente de um cão para outro (Little, Hostettler, & Kocan, 2007). Se as condições climáticas forem favoráveis, *R. sanguineus* pode completar 2 a 3 ciclos de vida por ano, apresentando, ainda, posturas na ordem de 5000 ovos (Silva, 2006). *R. sanguineus* pode atacar todo o corpo do cão, tendo, no entanto, preferência pela cabeça, particularmente junto às orelhas, espaços interdigitais e zona inguinal e axilar (Papazahariadou, Saridomichelakis, Koutinas, Papadopoulos & Leontides, 2003; Silveira, Passos & Ribeiro, 2009), fixando-se firmemente ao hospedeiro (Dantas-Torres, 2010b). Parece haver algumas raças com mais susceptibilidade à infestação, como o cocker spaniel inglês (Louly *et al.*, 2009). Quando a fêmea se encontra engorgitada, deixa o hospedeiro e após um período de pré-ovoposição, que pode durar de 3 dias a algumas semanas, deposita milhares de ovos (em lugares escondidos, como fendas ou rachas nas paredes, entre as rochas ou mesmo dentro do pavimento) (Dantas-Torres, 2010b). O período de incubação dos ovos é de 6 dias a algumas semanas (Dantas-Torres, 2008). O processo de muda inicia-se após o engorgitamento das larvas e das ninfas. Estas destacam-se do hospedeiro com o objectivo de encontrar um lugar escondido, para um período de isolamento (período de pré-muda), que pode durar de vários dias a algumas semanas (Dantas-Torres, 2010b). Este período é maior nas ninfas do que nas larvas e, mais demorado em condições climáticas desfavoráveis (Koch & Tuck, 1986). A elevada infestação pode causar anemia, particularmente em cães novos e se houver veiculação de *Ehrlichia* spp. (Kordick *et al.*, 1999)

#### **4.2.2. *Dermacentor reticulatus***

*Dermacentor reticulatus* apresenta olhos e 11 festões, a base do capítulo é retangular (mais larga que comprida), os palpos são curtos, as coxas dos machos aumentam de tamanho da primeira à quarta, o escudo é ornamentado e os machos não possuem placas adanais. A fêmea adulta apresenta uma área dorsal oval e porosa e a abertura genital apresenta a forma de “U” (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009). Os principais hospedeiros são os canídeos domésticos e silváticos (Silva, 2006). Os estádios imaturos de *D. reticulatus* encontram-se mais ativos no Verão. Apresentam distribuição desigual em Portugal, com prevalências maiores no Norte e podem transmitir *Babesia* spp. (Santos-Silva *et al.*, 2011).

#### **4.2.3. *Ixodes ricinus***

A espécie *I. ricinus* não possui olhos, festões nem ornamentação no escudo, sendo os seus palpos mais dilatados na junção dos segmentos dois e três (Bowman *et al.*, 2009). A fêmea engorgitada apresenta quatro pares de patas, cor clara, comprimento de 1 cm e forma de feijão. Apresentam uma cutícula, essencial para a sua sobrevivência, dado conter uma camada externa de cera impermeável à água. Os machos são muito menores, com apenas 2 a 3 mm de comprimento (Urquhart *et al.*, 1996). As formas adultas de *I. ricinus* apresentam-se, significativamente, mais infectadas por agentes patogénicos de transmissão através deste vector, que as ninfas (Schicht *et al.*, 2012). É uma espécie de evolução trifásica, exofítica e politrópica, verificando-se uma sazonalidade, com as formas adultas a encontrarem-se nos meses menos quentes (Setembro a Março) e as formas imaturas a terem maior atividade nos meses de Primavera e Verão. O ciclo de vida pode durar 3 anos e haver uma postura de até 3000 ovos. Se as condições foram desfavoráveis podem fazer diapausa (Silva *et al.*, 2006). *I. ricinus* pode alimentar-se numa variedade enorme de hospedeiros, podendo transmitir, também, vários agentes patogénicos, alguns deles zoonóticos (Xhaxhiu *et al.*, 2009). A espécie *I. ricinus* é o ixodídeo mais abundante na Europa, sendo conhecida por transmitir protozoários, vírus e bactérias patogénicas (Reye, Hübschen, Sausy & Muller, 2010) e é, também, a espécie ixodídea de maior importância no Homem (Silva *et al.*, 2006).

#### **4.2.4. Controlo de ixodídeos**

O controlo de ixodídeos pode ser efetuado por shampoos, sprays, pós, colares impregnados e *spot-on*, aplicados nos animais, contendo permetrina, amitraz, fipronil, imidaclopride, flumetrina e outros (Fourie *et al.*, 2013). O controlo de ixodídeos também deve ser efetuado no ambiente, através de produtos acaricidas, devendo ter especial atenção nas zonas de frestas, onde são frequentemente colocados os ovos.

#### **4.3. Pulgas**

As pulgas pertencem à Ordem Siphonaptera, sendo insectos desprovidos de asas e com três estádios larvais e um estadio pupal. As espécies que podem infestar o cão são *Ctenocephalides canis*, *C. felis* e ainda, *Pulex irritans*, sendo esta última a menos frequente (Urquhart *et al.*, 1996). As

pulgas alimentam-se de sangue do hospedeiro, podendo provocar reações alérgicas, prurido, lesões da pele e perda de pêlo, provocando uma dermatite alérgica, em animais susceptíveis (Heukelbach *et al.*, 2012; Bouhsira *et al.*, 2012). Algumas infestações por pulgas são difíceis de observar, nomeadamente quando existe um número muito reduzido deste ectoparasita. No entanto, as suas fezes podem ser detetadas por contraste de cor sobre papel ou tecido branco, apesar de serem o principal alimento das larvas dos três estádios (Bowman *et al.*, 2009). As pulgas podem transmitir agentes zoonóticos, como os céstodes *D. caninum*, *Hymenolepis diminuta* e *H. nana*.

#### **4.3.1. Ctenocephalides**

*Ctenocephalides* spp. possui simultaneamente, um pente genal e um pente frontal e, depositam os seus ovos brancos e brilhantes, com cerca de 0,5 mm de comprimento, no hospedeiro (Bowman *et al.*, 2009), ocorrendo a eclosão geralmente no solo. São responsáveis pela transmissão do céstodo *Dipylidium caninum* e do filarídeo *Achanthocheilonema reconditum* (Fernell & Faulkner, 1978; Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009). As larvas possuem peças bucais mastigadoras adequadas à ingestão de ovos de *D. caninum*. As microfilárias de *A. reconditum* são transmitidas por pulgas adultas (Bowman *et al.*, 2009).

##### **4.3.1.1. Ctenocephalides canis**

*C. canis* possui uma cabeça inferior ao dobro da altura e o 1º espinho do ctenídio genal é mais curto que o 2º espinho (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009).

##### **4.3.1.2. Ctenocephalides felis**

*C. felis* apresenta a cabeça com o dobro de comprimento em relação à altura e o 1º espinho de ctenídio genal é igual ao 2º espinho (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2009). Os ovos são colocados 2 dias após a infestação das pulgas, macho e fêmea (Bowman *et al.*, 2009). O desenvolvimento do ovo até adulto decorre a temperaturas de 13°C a 32°C e humidade relativa de 50-92%, passando pela fase larvar que se alimenta das fezes da pulga adulta, sofrendo duas mudas. Após 2 semanas, as larvas de 3º estadio metamorfizam-se em pulgas adultas. A espécie *C. felis* raramente abandona o hospedeiro, sendo a pulga com maior prevalência (Bowman *et al.*, 2009).

#### **4.3.2. Pulex irritans**

*Pulex irritans*, é também conhecida como a “pulga humana”, podendo, no entanto, atacar além destes, os suínos e os caninos (Bowman *et al.*, 2009). Não apresenta ctenídeos e a fronte é arredondada anteriormente (Urquhart *et al.*, 1996).

#### **4.3.3. Controlo de pulgas**

O controlo ambiental, como aspirar o pó, é a melhor forma de controlar estes parasitas, já que reduz o número de ovos, larvas, pupas e pulgas adultas em jejum (Bowman *et al.*, 2009). Podem ser utilizados produtos com imidaclopride, fipronil ou o spinosad. Um estudo recente (Bouhsira *et al.*,

2012) refere a eficácia da associação de dinotefuran, permetrina e piriproxifeno na quebra do ciclo de vida das pulgas, incluindo larvas e adultos. Os animais devem tomar anti-helmínticos com praziquantel/epsiprantel uma vez que a pulga é o vector de *D. caninum*. Produtos com piretrinas, carbaril, fosmet, tetraclorvinfós e metoprene também são eficazes no controlo das pulgas, quer nos animais, quer no ambiente (Bowman *et al.*, 2009).

### **Capítulo III. Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal**

#### **1. Objectivos**

Os principais objectivos deste trabalho foram:

- 1- Efectuar o rastreio parasitológico, o mais completo possível em cães errantes, nomeadamente os agentes zoonóticos, de forma a contribuir para o estudo sobre agentes parasitários em Portugal, e em especial numa população de difícil acesso e controlo.
- 2- Conhecer o panorama parasitológico numa área periurbana, com características mistas (urbana e rural), acrescentando assim, ferramentas úteis para futuras avaliações de risco e implementação de medidas de controlo de zoonoses e outras doenças nos cães, nomeadamente pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).
- 3- Melhorar a estratégia de diagnóstico e de profilaxia das principais parasitoses dos animais capturados em Vila Franca de Xira, instituídas no centro de recolha oficial.
- 4- Corroborar a importância da problemática dos cães errantes ao nível da saúde Pública e Animal.

Salienta-se o facto de terem sido realizados muito poucos estudos em populações de cães errantes, em Portugal, pela dificuldade de execução e, os poucos existentes, incidirem num número reduzido de parasitas, sendo muitas vezes executados com os animais já alojados nos canis oficiais, com possível contaminação interna.

#### **2. Material e Métodos**

##### **2.1. Caracterização da área geográfica do estudo e da população**

O Concelho de Vila Franca de Xira tem uma área de 317,7 Km<sup>2</sup>, dividindo-se em 11 freguesias (Alhandra, Alverca do Ribatejo, Cachoeiras, Calhandriz, Castanheira do Ribatejo, Forte da Casa, Póvoa de Santa Iria, São João dos Montes, Sobralinho, Vialonga e Vila Franca de Xira), representadas na figura 1. É um concelho caracterizado por zonas rurais e urbanas, na sua maioria junto ao rio Tejo, com uma população de 136.886 pessoas (censos definitivos de 2011, INE). Relativamente à população canina, encontram-se licenciados no concelho de Vila Franca de Xira 3184 animais. Os dados relativos a pessoas recenseadas e cães licenciados encontram-se na tabela 1.

Figura 1: Mapa geográfico das freguesias do concelho de Vila Franca de Xira.



Tabela 1: Número de pessoas recenseadas no concelho de Vila Franca de Xira e número de cães licenciados referentes ao ano de 2011, distribuídos pelas respetivas freguesias.

<b>Freguesias</b>	<b>Número de pessoas recenseadas*</b>	<b>Número de cães licenciados •</b>
<b>Alhandra</b>	6.047	153
<b>Alverca do Ribatejo</b>	31.070	513
<b>Cachoeiras</b>	766	65
<b>Calhandriz</b>	801	141
<b>Castanheira do Ribatejo</b>	7.500	295
<b>Forte da Casa</b>	11.056	189
<b>Póvoa de Santa Iria</b>	29.348	420
<b>São João dos Montes</b>	6.018	310
<b>Sobralinho</b>	5050	151
<b>Vialonga</b>	21.033	574
<b>Vila Franca de Xira</b>	18.197	373

\* Censos – resultados definitivos 2011.

• Fornecido pelas Juntas de Freguesia no ano de 2012, referente ao ano de 2011.

O concelho de Vila Franca de Xira apresenta várias zonas de caça municipais. A cultura da caça está bem instituída e, um elevado número de pessoas, possuem vários cães direcionados a esta actividade, pelo que as raças Pointer, Epagneul Bretão, Braco Alemão, Perdigueiro Português e, especialmente o Podengo Português, são bastante comuns. A raça Podenga é, inclusivamente, utilizada com frequência como animal de companhia, dada a facilidade de adaptação a espaços confinados e a forte presença nesta área territorial. Vila Franca de Xira é um concelho com uma extensa área rural, composta por inúmeras quintas e vivendas (frações rurais ou mistas), pelo que, existe um elevado número de cães de raças grandes, com funções de guarda, como o cão de Serra da Estrela, o cão de Pastor Alemão e várias raças potencialmente perigosas como o Rottweiler, Pit Bull Terrier e American Staffordshire Terrier.



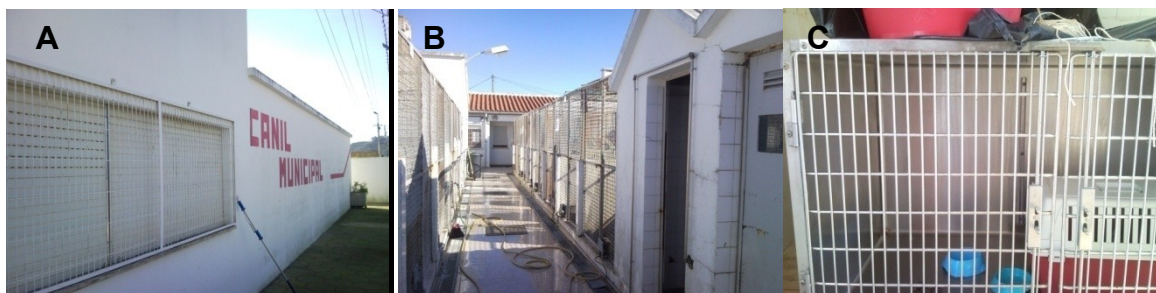
## 2.2. Clima

Foram consultados os boletins climatológicos do IPMA ([www.ipma.pt](http://www.ipma.pt)), nomeadamente as temperaturas médias mensais máximas e mínimas e a precipitação máxima diária, registadas na estação meteorológica de Lisboa/Geofísico, no período de outubro de 2011 a setembro de 2012 (período em que decorreu o estudo), conforme gráficos nº 3 e nº4.

## 2.3. Caracterização do canil municipal

O canil municipal localiza-se na freguesia da Castanheira do Ribatejo. Tem 430 m<sup>2</sup> de área total e é composto por 6 jaulas coletivas, 8 jaulas individuais, 2 jaulas de sequestro sanitário e uma jaula hospitalar. Possui ainda, um gabinete veterinário, um gabinete administrativo, uma sala de armazenagem de rações, equipamentos e produtos, uma sala com uma arca de acondicionamento de cadáveres, um vestiário, 2 casas de banho e uma cozinha (figura 2). A zona envolvente apresenta vegetação rasteira, possui várias valas de águas paradas e a presença de mosquitos, tendo que ser aplicado inseticidas com regularidade. É afastada de zonas habitacionais, havendo, nos arredores, algumas indústrias.

Figura 2: A) frente do canil municipal; B) acesso a jaulas de alojamento (individuais, coletivas e de sequestro) de cães; C) jaula hospitalar (originais).



## 2.4. Constituição e caracterização da amostra populacional

A população em estudo consistiu numa amostra de 80 cães, capturados no concelho de Vila Franca de Xira e que não foram reclamados. Não foi possível determinar o tempo que os animais permaneceram nas ruas, nem se deambularam por outro concelho limítrofe. Desconhece-se ainda, se os animais nasceram na via pública ou se foram abandonados e, em que período do crescimento decorreu este acontecimento. Não existe, ainda, informação, se alguns destes animais, eram “protegidos” por associações ou por pessoas particulares, que pudessem, de alguma forma, fornecer-lhes alimento, higienização e alguns tratamentos, nomeadamente profiláticos. Também não se sabe, se os animais cohabitavam com outros nas mesmas situações. Foram excluídos do grupo, os cachorros em lactação capturados juntamente com a mãe, tendo sido apenas considerada esta última. A idade dos animais foi estimada de acordo com vários fatores (dentição, tamanho corporal, presença de pelagem branca típica de animais idosos, opacidade do cristalino dos olhos). Foram

divididos pelas seguintes classes: animais em crescimento (até 1 ano), jovens adultos (1 a 2 anos), adultos (3 a 7 anos) e idosos (mais de 7 anos). Dado o desconhecimento genealógico dos animais foi atribuído a denominação da raça por características de padrão das raças existentes no livro genealógico português e, a raça American Pit Bull Terrier reconhecida pelo United Kennel Club. Relativamente ao porte do animal foram distinguidos 3 portes: pequeno ( $\leq 10$  kg p.v.), médio (10-25 kg p.v.) e grande ( $>25$  kg p.v.). Nos animais em crescimento, foi atribuído o porte que deverá apresentar o animal em adulto, tendo em conta a relação peso-idade-raça. Relativamente ao tamanho do pêlo, consideraram-se os tamanhos curto, médio e comprido.

## **2.5. Exame de estado geral**

O exame de estado geral consistiu na inspeção visual exterior de todos os animais e na palpação, auscultação cardíaca e pulmonar, medição de temperatura, otoscopia e inspeção da boca e dentes a todos os animais que permitiram estes procedimentos e, ainda, observação macroscópica das fezes.

## **2.6. Colheita das amostras e processamento**

A colheita das amostras necessárias para o estudo decorreu no dia de entrada dos animais ou nas 48 horas seguintes, no caso de animais mais agressivos ou que estivessem sob muita ansiedade e, após um exame prévio de estado geral. Posteriormente, foram efectuadas medidas profiláticas instituídas no canil municipal (ex: desparasitações) e tratamentos médico-veterinários necessários, consoante o caso. Nos animais gravemente doentes ou feridos, foram realizadas as intervenções médico-veterinárias (suturas, manejo da dor, etc.) antes da colheita das amostras, mas sempre dentro do período acima referido. Nenhum dos animais teve de ser abatido de urgência.

A recolha de parasitas externos visíveis foi a primeira colheita realizada. Assim, procedeu-se à colheita de ixodídeos e de pulgas, com o auxílio de uma pinça. Ambos foram colocados em frascos devidamente identificados, contendo álcool etílico a 70%. Para a recolha de sangue, efectuou-se a tricotomia de uma pequena zona do membro anterior esquerdo e desinfetou-se com álcool etílico 96%. Efectuou-se um garrote na veia cefálica, puncionando-se, de seguida, com uma seringa de 5ml e uma agulha de 21G x 25mm, colhendo-se entre 4 a 5 ml de sangue. Retirou-se a agulha e, em simultâneo efectuou-se a compressão com algodão humedecido em álcool etílico 96%. Realizaram-se esfregaços de sangue. Distribuiu-se, seguidamente, 2ml de sangue em dois tubos com EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*), sendo 1 ml em cada e 2ml de sangue num tubo seco e identificaram-se os mesmos. Os tubos com EDTA foram agitados suavemente, de forma a favorecer o contato do sangue com o EDTA e colocados no frigorífico. O tubo seco foi deixado numa posição ligeiramente inclinada durante 30 a 60 minutos. Nos casos em que se formou soro suficiente, procedeu-se à remoção do soro, utilizando-se uma seringa de 2ml e uma agulha de 23G, esterilizadas. Introduziu-se o soro num *ependorf*, devidamente identificado e colocou-se, de imediato, no congelador do canil municipal (a temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ ). Nos casos em que houve mais dificuldade de formação de soro, colocou-se o tubo na refrigeração, tendo-se efectuado, nos

dois dias seguintes, a centrifugação do mesmo, no laboratório da FMV, com remoção do soro e colocação em *eppendorf* e posterior congelação, à temperatura acima referida.

Foram efectuadas raspagens cutâneas, sempre que se observaram lesões e realizaram-se escovagens com escova dura, a todos os animais que apresentavam descamação, colocando-se o material resultante destas, em frascos devidamente fechados e identificados. Com o auxílio de um cotonete, foi colhido conteúdo existente no canal auditivo e colocado em frasco devidamente fechado e identificado. Posteriormente, procedeu-se ao confinamento do animal, em jaula individualizada. Nas 48 horas seguintes, efetuou-se uma recolha de fezes e colocou-se dentro de frasco devidamente fechado e identificado. Colocou-se o frasco no frigorífico. Sempre que foram detectados parasitas adultos nas fezes, estes foram devidamente separados para outros frascos contendo álcool etílico a 70 % e identificados.

Os métodos de diagnóstico efetuados encontram-se mencionados na tabela 2.

Tabela 2: Métodos de diagnóstico utilizados para os diferentes agentes parasitários.

Parasita	Método de diagnóstico (pesquisa)
<b><i>Leishmania infantum</i></b>	IFI – Leishmania Spot IFI (anticorpo) Teste “ Speed Leish K” (antigénio) Teste “ Speed DFV Leishmania (antigénio)
<b><i>Babesia canis</i></b>	IFI - Megascreeen Fluobabesia c., Megacor® (anticorpo) Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (protozoário)
<b><i>Hepatozoon canis</i></b>	Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (protozoário)
<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i></b>	IFI - Megascreeen Fluooanaplasma ph., Megacor® (anticorpo) Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (bactéria)
<b><i>Ehrlichia canis</i></b>	IFI - Megascreeen Fluoehrlichia c., Megacor® (anticorpo) Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (bactéria)
<b><i>Rickettsia conorii</i></b>	IFI - Megascreeen Fluorickettsia c., Megacor® (anticorpo) Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (bactéria)
<b><i>Mycoplasma haemocanis</i></b>	Coloração Giemsa em esfregaço sanguíneo (bactéria)
<b><i>Dirofilaria immitis</i></b>	Teste Speed Diro (adulto) Técnica de Knott modificada (microfilária)
<b><i>Angiostrongylus vasorum</i></b>	Técnica de Baermann (L <sub>1</sub> )
<b><i>Acantocheilonema reconditum</i></b>	Técnica de Knott modificada (microfilária)
<b><i>T. canis</i>; <i>T. leonina</i>; <i>S. stercoralis</i>; <i>A. caninum</i>; <i>U. stenocephala</i>; <i>T. vulpis</i> Família Taeniidae; <i>D. caninum</i></b>	Técnica de Willis (ovos)
<b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b>	Técnica de Ziehl-Neelsen (oocisto)
<b><i>Giardia</i> spp.</b>	Técnica de Ziehl-Neelsen (quisto)
<b><i>Demodex canis</i>; <i>Sarcoptes scabiei</i></b>	Raspagem cutânea e clarificação com Lactofenol (ovos, larvas, ninfas e adultos)
<b><i>Octodectes cynotis</i></b>	Produto de zaragatoa auricular clarificado com Lactofenol (ovos, larvas, ninfas e adultos)
<b><i>Cheyletiella yasguri</i></b>	Escovagem e clarificação com Lactofenol (ovos, larvas, ninfas e adultos)
<b><i>R. sanguineus</i>; <i>D. reticulatus</i>; <i>I. ricinus</i> <i>C. canis</i>; <i>C. felis</i>; <i>P. irritans</i></b>	Observação das estruturas morfológicas (larvas, ninfas e adultos)

### 2.6.1. Técnica de Imunofluorescência indirecta (IFI)

A técnica de imunofluorescência indirecta foi semelhante para os vários agentes etiológicos, tendo-se, no entanto, realizado diluições diferentes, consoante o limiar de positividade de cada teste para o respectivo agente. Para a pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* foi utilizado o teste comercial Leishmania Spot IFI (BioMérieux®). Para a pesquisa de anticorpos contra hemoparasitas foram utilizados testes comerciais: MegaScreen FLUOANAPLASMA phagocytophilum (Megacor®) na pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum*, MegaScreen FLUOBABESIA canis (Megacor®) na pesquisa de anticorpos anti-*B. canis*, MegaScreen FLUOEHRlichia canis (Megacor®) na pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii (Megacor®) na pesquisa de anticorpos anti-*R. conorii*. A técnica IFI compreendeu os passos descritos no anexo I. De referir que, o teste comercial MegaScreen FLUOBABESIA canis (Megacor®) para pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* deteta, simultaneamente, *B. canis*, *B. rossi* e *B. vogeli*. Relativamente ao limiar de positividade, foi considerado 1:80 para *L. infantum*, 1:32 para *B. canis*, 1:50 para *A. phagocytophilum*, 1:40 para *E. canis* e 1:64 para *R. conorii*, conforme indicações dos fabricantes.

### 2.6.2. Esfregaços de sangue com coloração Giemsa

A coloração de Giemsa em esfregaços de sangue consistiu nos seguintes passos:

- I- Preparação do esfregaço de sangue: **1)** colocou-se uma gota de sangue fresco (retirado do tubo com EDTA) numa lâmina; **2)** com o auxílio de uma lamela, deslizou-se suavemente sobre a lâmina de forma a espalhar a gota, deixando-se uma película muito fina de sangue; **3)** deixou-se secar completamente.
- II- Coloração Giemsa: **1)** colocou-se Metanol (Merck®) sobre o esfregaço de sangue e esperou-se 1 minuto; **2)** colocou-se o corante *Giemsa* puro (Merck ®) e aguardou-se 3 minutos; **3)** lavou-se com água corrente e deixou-se secar. **4)** Observou-se a lâmina ao microscópico ótico com ocular de 10x e objetiva de 100x (com óleo de imersão), percorrendo-a em 50 campos.

### 2.6.3. Teste “Speed Diro”

O teste *Speed Diro* (Virbac®) é um teste para detecção do antígeno de *Dirofilaria immitis* na circulação sanguínea, por meio de um imunoensaio qualitativo rápido, com recurso à imunocromatografia. Para a execução e interpretação do teste efectuaram-se os seguintes passos: **1)** adicionou-se uma gota de sangue total fresco no poço da amostra, utilizando uma pipeta descartável (em algumas situações foi adicionado uma gota de soro, após respetiva descongelação); **2)** seguidamente, adicionaram-se 5 gotas do reagente que acompanhava o *kit*, no respectivo poço da amostra; **3)** aguardou-se cerca de 10 a 15 minutos e procedeu-se à leitura dos resultados.

De acordo com o fabricante, o teste apresenta 99% de especificidade e 95,2% de sensibilidade, quando comparado com métodos de referência como a técnica de Knott modificada e o teste ELISA

em laboratório (<http://en.bvt.fr>, 12 de Janeiro de 2013). Na interpretação do teste rápido *Speed Diro* e, de acordo com as instruções do fabricante, considerou-se positivo, um resultado constituído por 2 bandas cor-de-rosa, perfeitamente distintas (correspondendo à banda do teste e à banda de controlo) e considerou-se negativo, um resultado constituído por 1 única banda cor-de-rosa (correspondendo à banda de controlo). Considerou-se ainda, um resultado inválido, aquele em que não aparecesse nenhuma banda de controlo e um resultado duvidoso, quando a banda de teste apresentava uma linha muito ténue. Nos casos de resultado inválido ou duvidoso, efectuou-se um novo teste, seguindo os passos acima descritos.

#### **2.6.4. Técnica de Knott modificada**

A técnica de Knott modificada é uma técnica que permite identificar microfilárias na circulação sanguínea periférica, permitindo distinguir *D. immitis* de outras microfilárias. Assim, as microfilárias de *D. immitis* apresentam extremidade anterior ovalada e extremidade posterior reta com cauda comprida e pontiaguda. Por sua vez, *A. reconditum* apresenta extremidade anterior achatada, com gancho cefálico e extremidade posterior curva com cauda em forma de anzol. Em critérios de tamanho, as microfilárias de *D. immitis* apresentam 290 a 330 µm de comprimento e 5 a 7 µm de largura, enquanto as de *A. reconditum* apresentam 260 a 283 µm de comprimento e 4 µm de largura (Genchi, Venco & Genchi, 2000). Para a realização desta técnica, efectuaram-se os seguintes passos: **1)** colocou-se num tubo de ensaio, 9 ml de Formol a 2%; **2)** juntou-se 1 ml de sangue contido no tubo com EDTA; **3)** agitou-se bem; **4)** centrifugou-se durante 3 minutos a 214G; **5)** retirou-se o sobrenadante; **6)** juntou-se uma gota de azul metileno e agitou-se; **7)** retiraram-se algumas gotas da amostra e colocaram-se entre lâmina e lamela; **8)** observou-se ao microscópio ótico com ocular de 10x e objectiva de 10x, percorrendo a lâmina em 50 campos.

#### **2.6.5. Técnica de Willis**

A técnica de Willis foi utilizada para pesquisa de ovos de nemátodes e de céstodes. Trata-se de um método de flutuação, que se baseia na diferença de flutuabilidade dos parasitas em relação aos resíduos alimentares (Bowman *et al.*, 2009). A técnica consistiu nos seguintes passos: **1)** colocou-se aproximadamente 2 grama de fezes, num copo com solução saturada de açúcar; **2)** agitou-se bem, com o auxílio de uma vareta de vidro; **3)** encheu-se um tubo de ensaio, passando o conteúdo do copo através de um passador até formar um menisco convexo; **4)** colocou-se uma lamela (desperdiçando o restante que ficou no copo); **5)** aguardou-se 10 a 15 minutos e retirou-se a lamela; **6)** colocou-se a lamela sobre uma lâmina e observou-se ao microscópio ótico nas ampliações de 100X e 400X, percorrendo a lâmina em 50 campos.

#### **2.6.6. Técnica de Ziehl-Neelsen**

A técnica de Ziehl-Neelsen foi utilizada para a pesquisa de quistos/oocistos de protozoários, compreendendo nos passos descritos no anexo II. Seguidamente, procedeu-se à observação da lâmina no microscópico ótico, utilizando-se a ampliação de 1000X (ocular de 10x e objectiva de 100X, com óleo de imersão), percorrendo-a em 50 campos.

#### **2.6.7. Técnica de Baermann**

A técnica de Baermann foi efetuada para pesquisar larvas de parasitas pulmonares, consistindo nos seguintes passos: **1)** Envolveu-se uma amostra de fezes, após homogeneização, dentro de uma gaze com as dimensões de 10 x 10 cm, de modo a formar uma “boneca” e colocou-se num copo cónico, previamente cheio de água tépida (a boneca deve ficar totalmente embebida e suspensa na água); **2)** Aguardou-se 24 horas, á temperatura ambiente; **3)** Após, retirou-se a “boneca” e deixou-se o conteúdo a sedimentar, durante cerca de 20 minutos; **4)** Retirou-se o sobrenadante; **5)** Aspirou-se, com uma pipeta, algumas gotas do sedimento e, colocou-se entre lâmina e lamela; **6)** Observou-se ao microscópio ótico com ampliação de 100 x, percorrendo 50 campos.

#### **2.6.8. Raspagem cutânea**

A técnica de raspagem cutânea foi utilizada para a pesquisa de ácaros da pele, tendo sido efetuada apenas a animais que apresentaram lesões cutâneas. A técnica consiste nos seguintes passos: **1)** formação de uma prega de pele entre os dedos, indicador e polegar; **2)** mergulhou-se uma lâmina de bisturi n.º 23 ou n.º 24, em óleo mineral; **3)** raspou-se com a lâmina na prega de pele, profundamente, até sangrar; **4)** transferiu-se o conteúdo da lâmina de bisturi para uma lâmina de vidro; **5)** adicionou-se 3 gotas de Lactofenol azul (Merck®); **6)** colocou-se uma lamela por cima e observou-se ao microscópio ótico utilizando-se a ocular de 10 x e a objectiva de 10 x. Foi colhido material cutâneo em cinco zonas distintas do corpo de cada animal sujeito a este teste.

#### **2.6.9. Colheita de cerúmen**

Foi efetuada colheita de cerúmen a todos os animais (n=80), para pesquisa de ácaros, consistindo nos seguintes passos: **1)** colocou-se um cotonete humedecido em soro fisiológico no canal auricular do animal; **2)** colheu-se um pouco de cerúmen; **3)** deslizou-se, cuidadosamente, o cotonete numa lâmina de vidro, deixando nesta a maior parte de conteúdo; **4)** colocou-se Lactofenol azul (Merck®) e observou-se ao microscópio óptico com uma ampliação de 100 x; **5)** procedeu-se de igual modo com o outro conduto auditivo.

#### **2.6.10. Escovagem do pêlo**

Foi efetuada escovagem com escova dura a todos os animais que apresentavam descamação (n=12), para pesquisa de ácaros, consistindo nos seguintes passos: **1)** escovagem no dorso do animal e, em especial, nos locais de descamação, recolhendo o produto para uma folha de papel de cor escura; **2)** colocou-se numa lâmina o conteúdo colhido no passo anterior; **3)** colocou-se Lactofenol azul (Merck ®) e observou-se ao microscópio ótico com uma ampliação de 100 x.

#### **2.6.11. Colheita de ectoparasitas macroscópicos**

Para a colheita de ectoparasitas efetuaram-se os seguintes passos: **1)** Colheram-se os ectoparasitas com o auxílio de uma pinça e colocaram-se em frascos com álcool etílico a 70 %, devidamente identificados; **2)** observaram-se ao microscópio estereoscópico.

### **2.7. Análise estatística**

Os dados obtidos nos diversos testes executados foram, inicialmente, armazenados em ficheiro *Excel/ 2007 - Microsoft Office*. Posteriormente, procedeu-se à análise estatística, determinando-se as prevalências através da plataforma *EpiTools*, utilizando-se intervalo de confiança (IC) de 95% e de acordo com os limites de Blaker (Reiczigel, Földi & Ózsvári, 2010), ajustando-se assim as prevalências aparentes à sensibilidade e especificidade dos vários testes, sempre que possível. Procedeu-se ainda, à determinação de possíveis associações estatísticas, utilizando-se o teste Exacto de Fisher, o teste Qui-Quadrado e o teste *Odds Ratio*, consoante os casos aplicáveis, com um intervalo de confiança de 95%, assumindo-se o nível de significância  $p < 0,05$ . Para tal utilizou-se o software *R* (R Core Team, 2012)), o software Epi Info 7 ([CDC](#) – Epi Info™ 7) e a plataforma Interactive Chi-Square Tests (Interactive Chi-Square Tests – Kristopher J. Preacher).

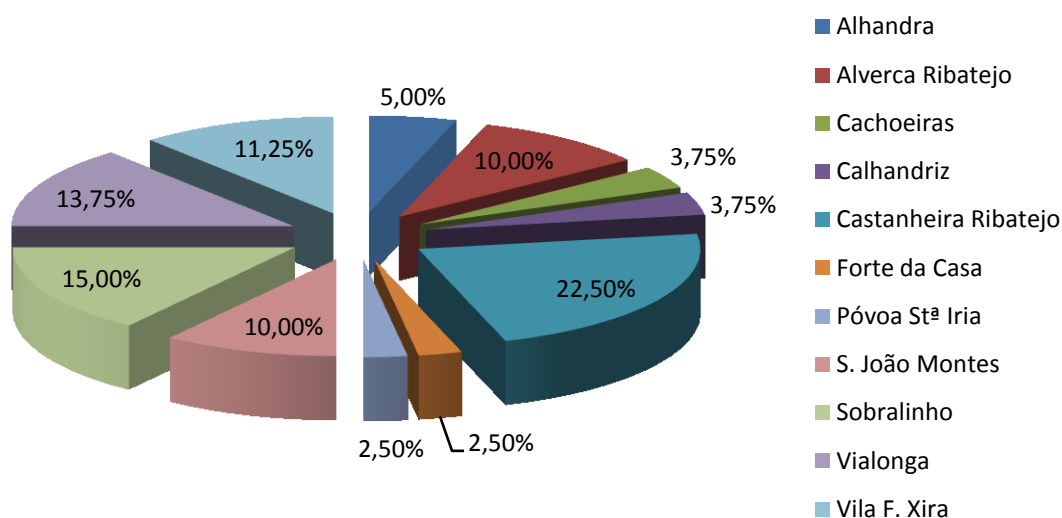
## **3. Resultados**

### **3.1. Caracterização da amostra populacional**

Oitenta animais (tabela 3, anexo III) foram capturados nas freguesias pertencentes ao concelho de Vila Franca de Xira.

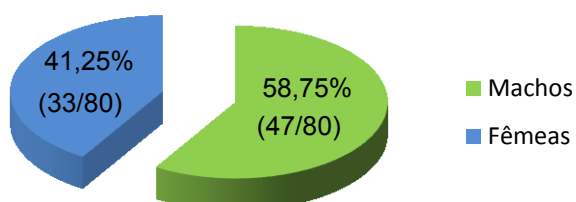
A distribuição do número de animais (n) por freguesia foi: Alhandra (n=4), Alverca do Ribatejo (n=8), Cachoeiras (n=3), Calhandriz (n=3), Castanheira do Ribatejo (n=18), Forte da Casa (n=2), Póvoa de Santa Iria (n=2), São João dos Montes (n=8), Sobralinho (n=12), Vialonga (n=11), Vila Franca de Xira (n=9) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra pelas freguesias onde foram capturados.



Relativamente ao sexo dos animais, a sua distribuição encontra-se no gráfico 2, e a divisão das fêmeas (n=33) por fase reprodutiva pode ser observada na tabela 4.

Gráfico 2 – Proporção de animais do sexo masculino e feminino do estudo.



De referir que, nenhum dos animais se apresentava esterilizado, tendo sido, contudo, realizado apenas observação externa. Nas fêmeas efetuou-se visualização de possíveis incisões cutâneas que pudessem levantar suspeita esterilização cirúrgica. Todos os machos (n=47) apresentavam, à palpação, ambos os testículos.

Tabela 4: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais do sexo feminino (n=33), por fase reprodutiva.

Fase Reprodutiva	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>Gestação</b>	4	12,12
<b>Lactação</b>	3	9,06
<b>Outras</b>	26	78,79



Os animais foram distribuídos por 4 grupos etários: < 1 ano (em crescimento), de ≥ 1 a < 3 anos (jovens adultos), de ≥ 3 a < 7 anos (adultos), ≥ 7 anos (idosos), sendo a distribuição etária referida na tabela 5.

Tabela 5: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por grupo etário.

Idade (anos)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<1	11	13,75
[1; 3[	26	32,50
[3; 7[	19	23,75
≥ 7	24	30,00

A idade mínima foi 3 meses e a idade máxima foi 14 anos. A estimativa da média foi 4,67 anos e da moda 2 anos (n=18).

Os animais foram distribuídos por raça, porte e comprimento do pêlo, conforme tabelas 6, 7 e 8, respetivamente.

Tabela 6: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por raça.

Raças	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>American Pit Bull Terrier</b>	4	5,00
<b>American Staffordshire Terrier</b>	2	2,50
<b>Boxer</b>	2	2,50
<b>Braco Alemão</b>	1	1,25
<b>Caniche</b>	4	5,00
<b>Cão da Serra de Aires</b>	1	1,25
<b>Cruzado de American Pit Bull Terrier <sup>1</sup></b>	2	2,50
<b>Cruzado de Boxer <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Cruzado de Caniche <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Cruzado de cão de Serra da Estrela <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Cruzado de Cocker Spaniel <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Cruzado de Pequinês <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Cruzado de Podengo Português <sup>1</sup></b>	6	7,50
<b>Cruzado de Pointer <sup>1</sup></b>	1	1,25
<b>Epagneul Bretão</b>	2	2,50
<b>Husky Siberiano</b>	3	3,75
<b>Pastor Alemão</b>	2	2,50
<b>Pastor Belga</b>	1	1,25
<b>Podengo Português</b>	4	5,00
<b>Cão de Serra da Estrela</b>	2	2,50
<b>SRD <sup>2</sup></b>	37	46,25
<b>Rottweiler</b>	1	1,25

1- Cães cruzados: fenotipicamente muito similares à raça de origem

2- SRD: sem raça determinada

Tabela 7: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais por porte corporal.

Porte corporal	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>Pequeno</b>	13	16,25
<b>Médio</b>	36	45,00
<b>Grande</b>	31	38,75

Tabela 8: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais por tamanho do pêlo.

Comprimento do pêlo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>Curto</b>	47	58,75
<b>Médio</b>	21	26,25
<b>Comprido</b>	12	15,00

O período em que decorreu o estudo (outubro de 2011 a setembro de 2012), foi dividido em 4 trimestres, de acordo com a sazonalidade (outubro a dezembro de 2011, janeiro a março de 2012, abril a junho de 2012 e julho a setembro de 2012), conforme tabela 9.

Tabela 9: Frequências absoluta e relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por trimestre de captura.

Trimestre	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>Outubro a Dezembro 2011</b>	14	17,50
<b>Janeiro a Março 2012</b>	26	32,50
<b>Abril a Junho 2012</b>	18	22,50
<b>Julho a Setembro 2012</b>	22	27,50

### 3.2. Clima

Durante o período em que decorreu o estudo (outubro de 2011 a setembro de 2012) foram registadas, na estação meteorológica de Lisboa/Geofísico ([www.ipma.pt](http://www.ipma.pt)), as temperaturas médias mensais máximas e mínimas (gráfico 3) e a precipitação máxima diária (gráfico 4).

Gráfico 3: Temperaturas máxima e mínima registadas na estação meteorológica de Lisboa, nos meses de outubro de 2011 a setembro de 2012 (www.ipma.pt).

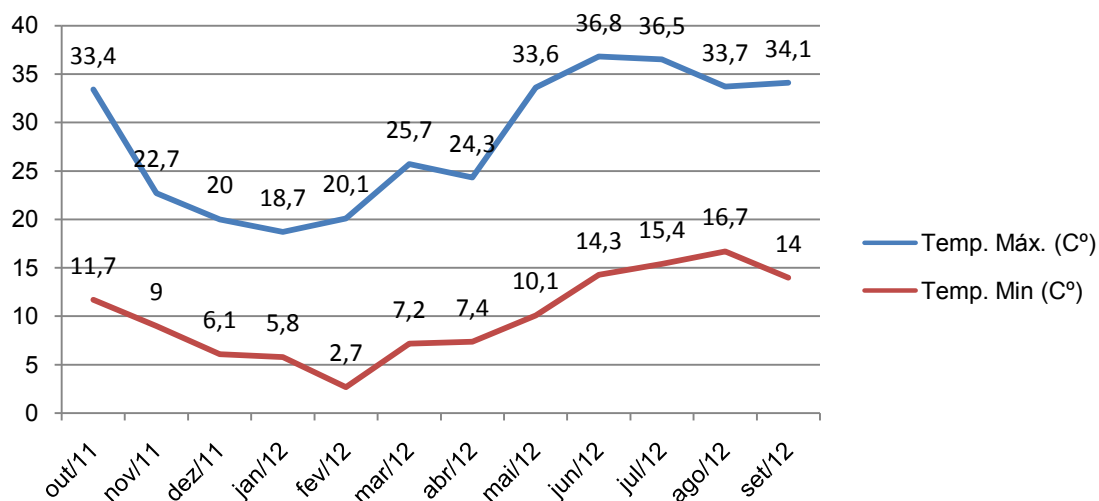
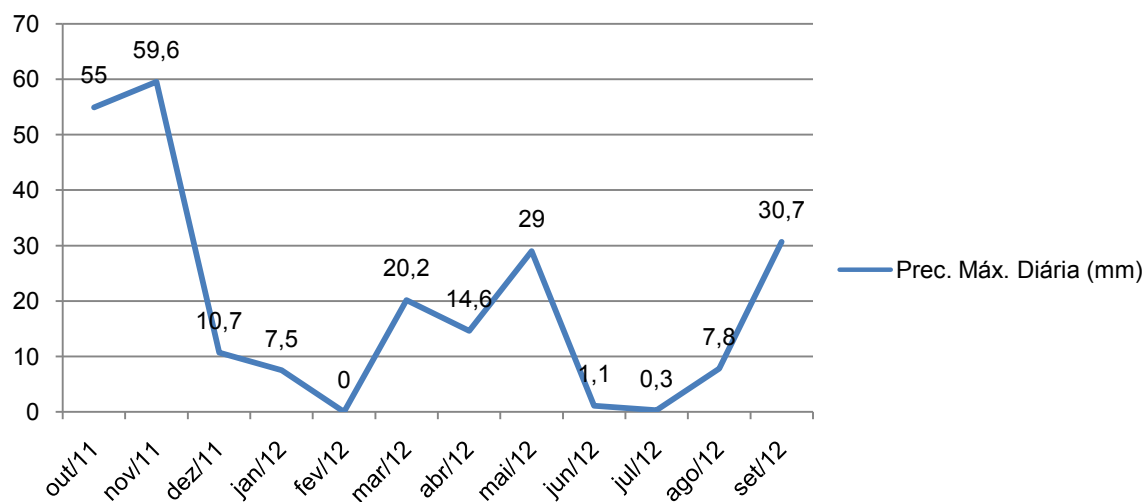


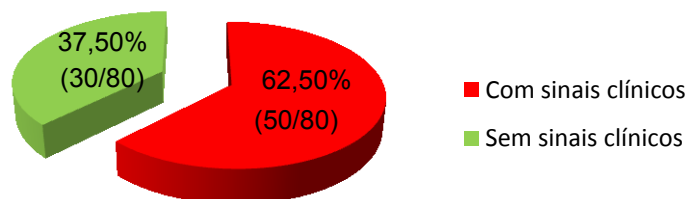
Gráfico 4: Precipitação máxima diária, registada na estação meteorológica de Lisboa, nos meses de outubro de 2011 a setembro de 2012 (www.ipma.pt).



### 3.3. Exame de estado geral

No decorrer do exame de estado geral, foram identificados animais com sinais clínicos sugestivos de doença, conforme a tabela 10 (anexo IV) e gráfico 5.

Gráfico 5: Proporção de animais com sinais clínicos de doença e sem sinais clínicos de doença, no exame de estado geral.



Salienta-se que, nem todos os sinais observados foram compatíveis com a infecção parasitária identificada. Assim, apenas 43,75% (35/80) apresentaram sinais clínicos sugestivos da infecção parasitária detetada.

### 3.4. Dados parasitológicos gerais

Os resultados dos testes parasitológicos efetuados à amostra populacional, encontram-se na tabela 11 (anexo V). De acordo com o panorama parasitológico da amostra (n=80), detetou-se a presença de parasitas ou de anticorpos contra parasitas em 100 % dos animais (80/80), sendo que, em 93,75 % (75/80) foi detetada a presença de parasitas e nos restantes 6,25 % (5/80) foi detetado apenas anticorpos contra os agentes parasitários. Por unidades orgânicas ou funcionais, foi detetado na amostra: 92,5 % (74/80) de parasitas ou anticorpos contra parasitas do sangue ou do sistema macrofágico fagocitário, 22,5 % (18/80) parasitas do aparelho cardiovascular, respiratório e serosas, 72,5 % (58/80) de parasitas do aparelho digestivo e 37,5 % (30/80) de ectoparasitas.

### 3.5. Detecção de *Leishmania infantum* por IFI

Os resultados obtidos na deteção de anticorpos anti-*L. infantum*, pela técnica IFI, encontram-se mencionados no gráfico 6 e, o aspeto das amostras positivas e negativas, na figura 3.

Gráfico 6: Prevalência infecção por *L. infantum* pela técnica de IFI.

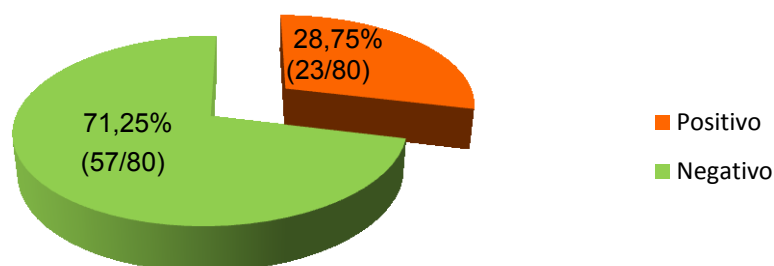
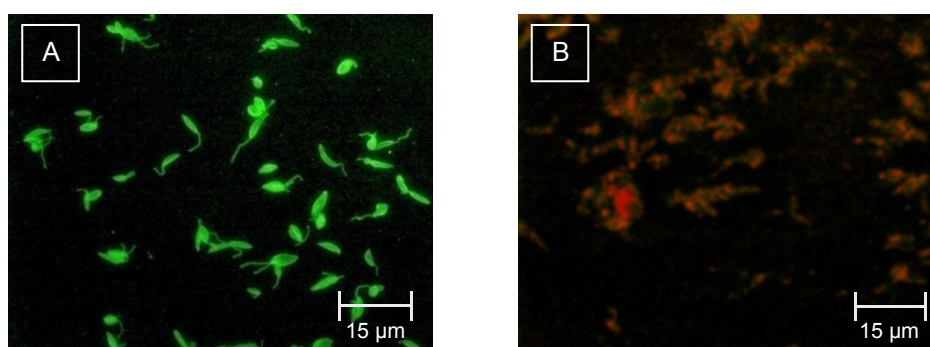


Figura 3: Aspecto dos resultados de *L. infantum* obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais).



Dos animais positivos a *L. infantum* (n=23), 82,61 % (19/23) eram sintomáticos e 17,39 % (4/23) eram assintomáticos. Os sinais clínicos observados encontram-se mencionados, por ordem de frequência, na tabela 12, encontrando-se alguns representados na figura 4.

Tabela 12: Frequência absoluta e relativa (%) dos sinais clínicos observados nos animais positivos a *L. infantum* (N=23).

Sinal clínico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<b>Hiperqueratose</b>	11	47,83
<b>Perda de peso</b>	10	43,48
<b>Alopécia</b>	9	39,13
<b>Descamação</b>	9	39,13
<b>Onicogrifose</b>	6	26,09
<b>Úlceras muco-cutâneas</b>	6	26,09
<b>Linfonodos aumentados</b>	5	21,74
<b>Debilidade muscular</b>	5	21,74
<b>Nódulos intra-dérmicos</b>	3	13,04
<b>Dor articular</b>	2	8,70

Figura 4: Sinais clínicos observados em animais da amostra, positivos a *L. infantum* - A) onicogribose; B) lesões muco-cutâneas ulcerativas nasais; C) Epistáxis; D) Alopecia exfoliativa no membro anterior direito; E) Evidente caquexia; F) Conjuntivite purulenta, blefarite e alopecia periocular exfoliativa; G) Dermatite exfoliativa com alopecia generalizada; H) Dermatite papular no tronco (originais).



Por não terem sido realizadas análises hematológicas e bioquímicas, não foram caracterizadas as formas clínicas dos animais positivos a *L. infantum*, nem foi utilizada a classificação IRIS.

### 3.5.1. Influência de fatores

Foram determinadas as frequências absolutas e prevalências de animais com *L. infantum* por época do ano, comprimento do pêlo, grupo etário e sexo (tabela 13) e, avaliada a possibilidade de associação estatística entre estes fatores e a positividade a *L. infantum* (tabela 14).

Tabela 13: Frequência absoluta e prevalência aparente de animais infectados com *L. infantum* por época do ano, comprimento do pêlo e idade.

		Cães (n)	Frequência absoluta de animais com <i>L. infantum</i>	Prevalência aparente de animais com <i>L. infantum</i> (%)
Época do ano	Out-Dez	14	2	14,29
	Jan-Mar	26	6	23,08
	Abr-Jun	18	6	33,33
	Jul-Set	22	9	40,91
Comprimento do pêlo	Curto	47	13	26,66
	Médio	21	7	33,33
	Comprido	12	3	25,00
Idade	<1	11	0	0,00
	[1; 3[	26	3	11,50
	[3; 7[	19	9	47,37
	≥ 7	24	11	45,83
Sexo	Masculino	47	16	34,04
	Feminino	33	7	21,21

Tabela 14: Associação estatística entre a infecção por *L. infantum* e a época do ano, comprimento do pêlo, idade e sexo.

Agente parasitário	Época do ano	Comprimento do pêlo	Idade	Sexo
<b><i>L. infantum</i></b>	$p = 0,621$	$p = 0,850$	<b><math>p = 0,002</math></b>	$p = 0,212$

A interpretação da tabela 14 revelou que existe apenas associação estatisticamente significativa (para o nível de significância convencionado de 0,05%) entre ter infecção por *L. infantum* e a idade do cão ( $p=0,002$ ). A prevalência de *L. infantum* no grupo etário correspondente aos animais adultos é de 47,37% (9/19) e a correspondente aos animais idosos, é de 45,83% (11/24), muito superior ao ocorrido em animais em crescimento e jovens adultos, sendo respetivamente de 0% (0/11) e 11,5 % (3/26). Observou-se, ainda, uma seroprevalência crescente ao longo do estudo, apesar de não se ter verificado uma associação estatisticamente significativa.

De seguida, procedeu-se a um reagrupamento de idades, dividindo-se os animais nas faixas etárias: < 1 ano, de 1 a < 2 anos, de 2 a < 5 anos, de 5 a < 8 anos, de 8 a < 11 anos e > 11 anos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Frequência absoluta e prevalência aparente (%) de animais infetados com *L. infantum* por idade e respetiva associação estatística.

Idade (anos)	Cães (n)	Frequência absoluta de animais com <i>L. infantum</i>	Prevalência aparente de animais com <i>L. infantum</i> (%)	Associação estatística
< 1	11	0	0,00	<b><math>p = 0,0000785</math></b>
[1; 2[	8	2	25,00	
[2; 5[	26	3	11,54	
[5; 8[	13	8	61,54	
[8;11[	13	10	76,92	
≥ 11	9	0	0,00	

De acordo com os resultados obtidos na tabela 15 verifica-se uma associação estatisticamente muito significativa, entre a idade do animal e a prevalência de *L. infantum*. As maiores prevalências foram observadas em animais de 8 a 11 anos (76,92%) e em animais de 5 a 8 anos (61,54%). Verificou-se prevalência nula em animais com menos de 1 ano e com mais de 11 anos de idade. Verificou-se, ainda, que os animais com 5 ou mais anos de idade têm um maior risco de positividade, que os animais com idade inferior a 5 anos (OR = 8,47; IC 95% 2,70 – 26,53).



### 3.6. Detecção de hemoparasitas

#### 3.6.1. Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo

Não foi possível efetuar-se um esfregaço sanguíneo adequado em 3 animais (ID-1, ID-30 e ID-40), uma vez que o sangue já se encontrava hemolisado. Nos restantes 77 animais, não foi observado qualquer agente hemoparasitário. De referir que, em 3 animais (ID-19, ID-52 e ID-70) foram observados muitos eosinófilos e no esfregaço de sangue do animal ID-73 foram observadas microfilárias (figura 10C).

#### 3.6.2. Detecção de anticorpos de hemoparasitas por IFI

Por métodos indiretos, foi verificado que 90,0% (72/80) dos animais apresentavam infeção pelo menos por um hemoparasita. A sensibilidade e especificidade dos diferentes testes de diagnóstico executados encontram-se mencionados na tabela 16.

Tabela 16: Sensibilidade (%) e Especificidade (%) dos testes de diagnóstico efetuados para os vários agentes hemoparasitários.

Agente	Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<b><i>B.canis</i></b>	MegaScreen FLUOBABESIA canis (Megacor®)	100,0 *	100,0 *
<b><i>A. phagocytophilum</i></b>	MegaScreen FLUOANAPLASMA phagocytophilum (Megacor®)	94,3	95,5
<b><i>E.canis</i></b>	MegaScreen FLUOEHRlichia (Megacor®)	95,5	94,3
<b><i>R.conorii</i></b>	MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii (Megacor®)	100,0 *	100,0 *

\* Valor assumido por inexistência de informação fornecida pelo laboratório, pelo que seriam necessários estudos que não se incluem no âmbito da tese.

A deteção de anticorpos por IFI permitiu o cálculo das seroprevalências referidas na tabela 17. Deste modo, obteve-se por ordem decrescente, uma seroprevalência de 76,2 % para *R. conorii*, 57,5 % para *B. canis*, 34,0 % para *E. canis* e 34 % para *A. phagocytophilum*.

Tabela 17: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respetivos intervalos de confiança a 95%, dos hemoparasitas testados por IFI na amostra da população.

Agente	Frequência Absoluta	Prevalência Aparente (%)	IC de 95 %	Prevalência Real (%)	IC de 95 (%)
<b><i>B. canis</i></b>	46	57,5	46,2-68,3	57,5	46,2-68,3
<b><i>A. phagocytophilum</i></b>	28	35,0	25,5-45,9	34,0	22,5-46,4
<b><i>E. canis</i></b>	29	36,2	26,6-47,2	34,0	22,6-46,5
<b><i>R. conorii</i></b>	61	76,2	65,8-84,8	76,2	65,8-84,8

O aspeto das amostras positivas e negativas pela técnica de IFI pode ser observado nas figuras 5, 6, 7 e 8.

Figura 5: Aspecto dos resultados de de *B. canis* obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais).

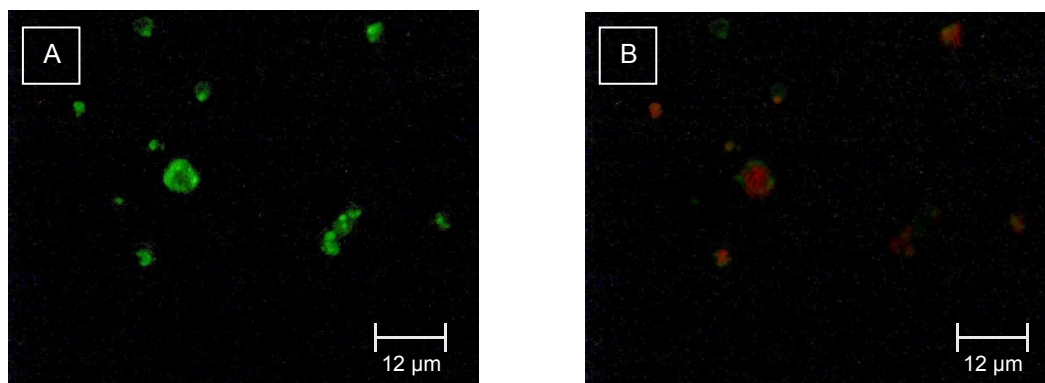


Figura 6: Aspecto dos resultados de *A. phagocytophilum* obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais).

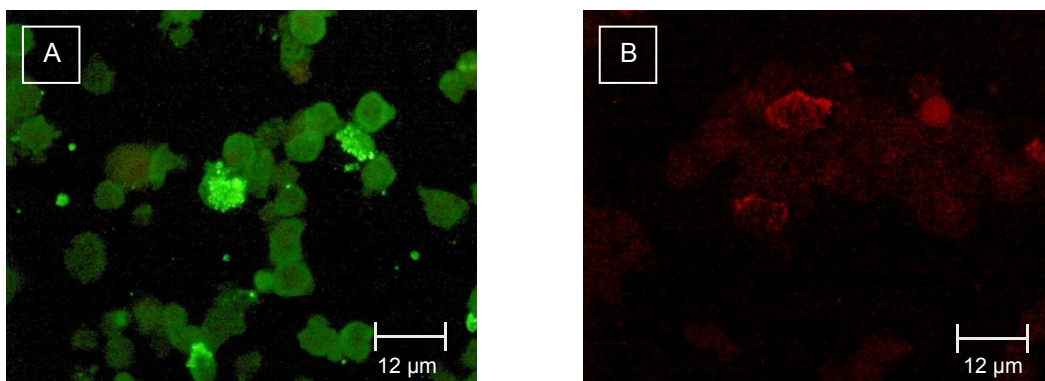


Figura 7: Aspecto dos resultados de *E. canis* obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais).

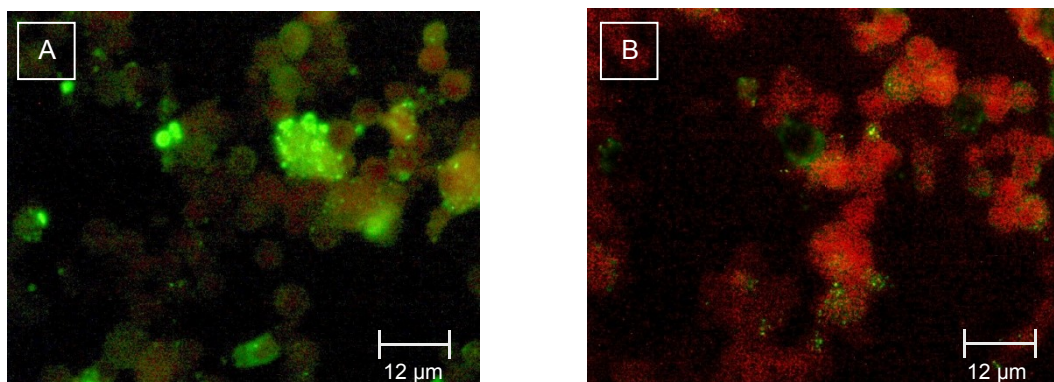
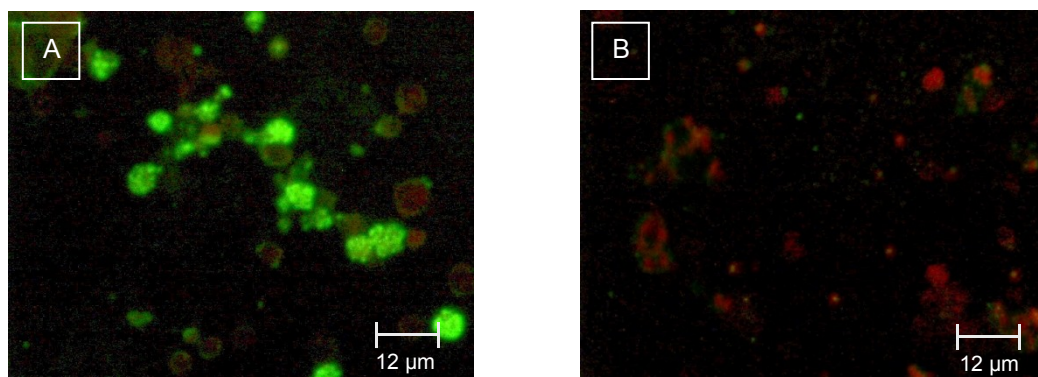
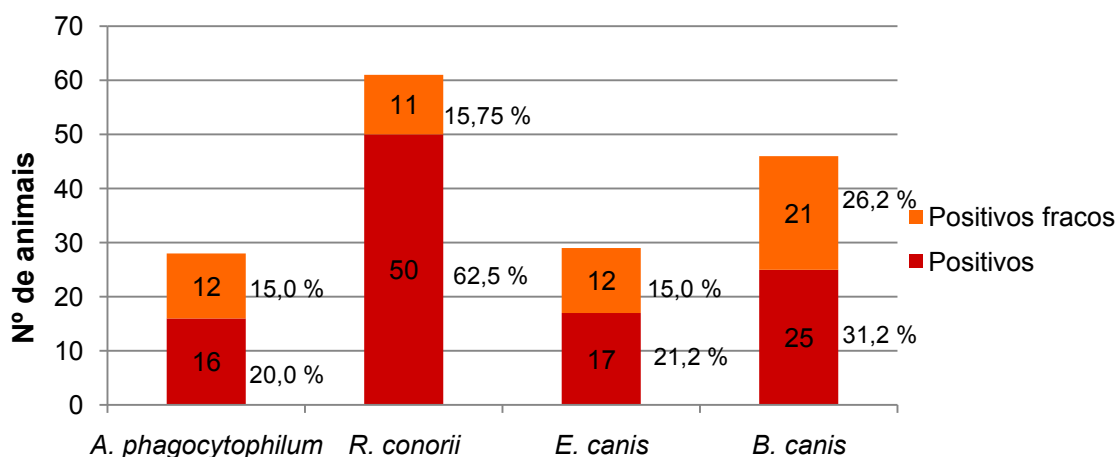


Figura 8: Aspecto dos resultados de *R. conorii* obtidos por IFI: amostra positiva (A) e negativa (B) (originais).



De referir que várias amostras apresentaram um resultado positivo fraco, um pouco mais atenuado do que o controlo, mas ainda positivo. O gráfico 7 apresenta a proporção de resultados positivos e positivos fracos, para os vários agentes estudados.

Gráfico 7: Proporção de resultados positivos e positivos fracos, dos hemoparasitas testados por IFI, na população amostrada.



### 3.6.3. Co-infecções por hemoparasitas

A infecção por múltiplos agentes hemoparasitários, verificou-se em 76,4% (55/72) dos animais infetados, sendo que, 37,5% (30/80) encontravam-se co-infetados por dois agentes, 16,2 % (13/80) por três agentes e 15,0% (12/80) pelos quatro agentes hemoparasitários estudados. Os vários tipos de co-infecções encontrados podem ser observados na tabela 18.

Tabela 18: Tipos de co-infecções observadas, frequência absoluta e frequência relativa de animais co-infetados.

Parasitas	Frequência Absoluta	Frequência relativa (%)
<b><i>Babesia</i> spp.+ <i>A. phagocytophilum</i></b>	2	2,50
<b><i>Babesia</i> spp.+ <i>R. conorii</i></b>	17	21,25
<b><i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i></b>	3	3,75
<b><i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i></b>	6	7,50
<b><i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i></b>	2	2,50
<b><i>Babesia</i> spp.+ <i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i></b>	1	1,25
<b><i>Babesia</i> spp.+ <i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i></b>	1	1,25
<b><i>Babesia</i> spp. + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i></b>	8	10,00
<b><i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i></b>	3	3,75
<b><i>Babesia</i> spp.+ <i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i></b>	12	15,00

#### 3.6.4. Avaliação de fatores de influência

Avaliou-se a presença de *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii*, de acordo com variáveis globais como a presença de ixodídeos, a época do ano e a idade do animal, conforme as tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Frequência absoluta e prevalência aparente (%) de animais infetados com *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*, por presença de ixodídeos, época do ano e idade.

Cães (n)			Frequência absoluta e Prevalência aparente (%)							
			<i>B. canis</i>		<i>A. phagocytophilum</i>		<i>E. canis</i>		<i>R. conorii</i>	
Presença ixodídeos	Sim	19	8	42,11	6	31,58	6	31,58	14	73,68
	Não	61	38	62,30	22	36,07	23	37,70	47	77,05
Época do ano	Out- Dez	14	10	71,42	7	50,00	8	57,14	11	78,57
	Jan – Mar	26	14	53,85	11	42,31	7	26,92	15	57,69
	Abr – Jun	18	12	66,67	2	11,11	6	33,33	16	88,89
	Jul – Set	22	10	45,45	8	36,36	8	36,36	19	86,36
Idade	<1	11	7	63,64	5	45,45	4	36,36	5	45,45
	[1; 3[	26	14	53,85	9	34,62	12	46,15	21	80,77
	[3; 7[	19	11	57,89	6	31,58	6	31,58	16	84,21
	≥ 7	24	14	58,33	8	33,33	7	29,17	19	79,17

As prevalências de anticorpos anti-hemoparasitas testados por IFI são superiores nos animais sem presença de ixodídeos (tabela 19), quando comparadas com os que apresentam. No entanto, a associação estatística não é significativa (tabela 20). Pode-se ainda, constatar que, a prevalência de *R. conorii* foi inferior no grupo etário de animais <1 ano e, a prevalência de *B. canis* foi, superior nos meses de outubro a dezembro.

Tabela 20: Associação estatística entre a infecção por *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* e a presença de ixodídeos e a época do ano.

Agente	Presença de ixodídeos	Época do ano	Idade
<b><i>B.canis</i></b>	$p=0,705$	$p=0,365$	$p=0,956$
<b><i>A. phagocytophilum</i></b>	$p=0,699$	$p=0,088$	$p=0,883$
<b><i>E.canis</i></b>	$p=0,783$	$p=0,297$	$p=0,614$
<b><i>R.conorii</i></b>	$p=0,208$	$p=0,127$	$p=0,204$

De acordo com os dados constantes na tabela 20, não foram verificadas associações estatisticamente significativas entre os agentes *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii* pesquisados e as variáveis presença de ixodídeos, época do ano e idade.

### 3.7. Detecção de parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas

#### 3.7.1. Detecção de *D. immitis* pelo teste rápido *Speed Diro*

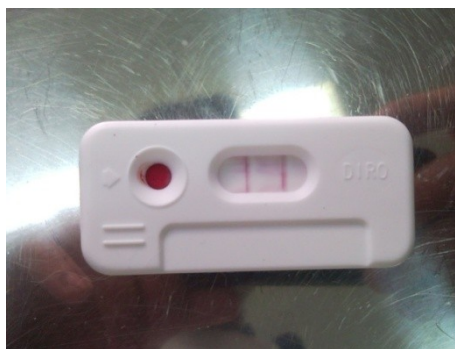
A detecção de antígeno de *D. immitis*, em circulação sanguínea, pelo teste *Speed Diro* (figura 9) apresenta, de acordo com o fabricante, uma sensibilidade de 95,2% e uma especificidade de 99,0%. Foi assim, observada uma prevalência real de 12,2 % (Tabela 21).

Tabela 21: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respectivos intervalos de confiança de 95%, de *D. immitis*, pelo teste *Speed Diro*, na amostra populacional.

Agente	Frequência Absoluta	Prevalência Aparente (%)	IC de 95 %	Prevalência Real (%)	IC de 95 (%)
<b><i>D. immitis</i></b>	10	12,5	6,9-21,5	12,2	5,8-21,8



Figura 9: Fotografia de resultado positivo no teste rápido *Speed Diro* (original).



A primeira banda (cor-de-rosa) corresponde à ligação de anticorpos específicos à membrana após migração por capilaridade, do complexo conjugado/antígeno. A segunda banda corresponde ao controle do teste.

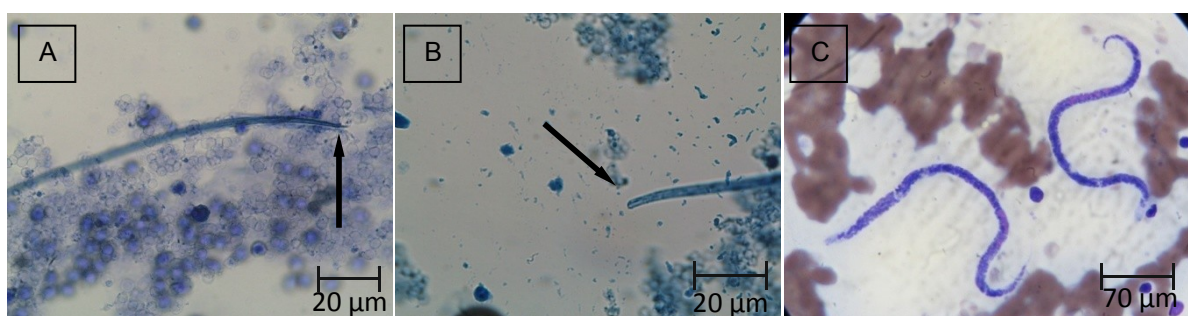
### 3.7.2. Pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott modificada

A técnica de Knott modificada revelou uma prevalência de 20,00% (16/80) de animais com microfilarémia, das espécies *D. immitis* (8/80) e *A. reconditum* (9/80) (Tabela 22).

Tabela 22: Número e prevalência (%) de animais com microfilárias de *D. immitis* e *A. reconditum*, observado ao M.O., utilizando-se a técnica de Knott modificada.

Microfilárias	Frequencia absoluta	Prevalência (%)
<b><i>D. immitis</i></b>	8	10,00
<b><i>A. reconditum</i></b>	9	11,25

Figura 10: Microfilárias de *D. immitis* (A- técnica de Knott) e de *A. reconditum* (B- técnica de Knott); C – esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa (originais).



Todos os animais que tiveram resultados positivos na pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott modificada tiveram, também, resultados positivos na detecção de antígeno de *D. immitis* pelo teste rápido *Speed Diro* (ELISA). No entanto, não foram identificadas microfilárias em 2 animais (ID-45 e ID-58) que tiveram resultado positivo no teste rápido *Speed Diro*, verificando-se assim, uma

prevalência de 80,0% (8/10) com microfilarémia. De referir que, um animal (ID-19) apresentou um número elevado de eosinófilos por observação em esfregaço sanguíneo.

### 3.7.3. Co-infecções

Foram detetados 5 cães (ID-18, 19, 58, 67, 77) positivos a *D. immitis* e *L. infantum*, em simultâneo. Foi observado um animal (ID-73) com infeção mista de *D. immitis* e *A. reconditum*, pela técnica de Knott modificada.

### 3.7.4. Influência de fatores na infeção por *D. immitis*

Avaliou-se a infeção por *D. immitis* de acordo com variáveis globais como a idade, época do ano e comprimento do pêlo, tendo-se obtido os resultados constantes nas tabelas 23 e 24. De referir que, foi considerado infetado um animal que tenha um resultado positivo no teste *Speed* Diro ou na pesquisa de microfílaras pela técnica de Knott modificada.

Tabela 23: Frequência absoluta e prevalência de animais infetados com *D.immitis* por idade, época do ano e comprimento do pêlo.

		Amostra (n)	Frequência absoluta	Prevalência (%)
Idade	<1	11	0	0,00
	[1; 3[	26	4	15,38
	[3; 7[	19	4	21,05
	≥ 7	24	2	8,33
Época do ano	Out-Dez	14	0	0,00
	Jan-Mar	26	3	11,54
	Abr-Jun	18	2	11,11
	Jul-Set	22	5	22,73
Comprimento do pêlo	Curto	47	7	14,89
	Médio	21	2	9,52
	Comprido	12	1	8,33

Tabela 24: Associação estatística entre a infeção por *D. immitis* e a idade, época do ano e comprimento do pêlo.

Agente	Idade	Época do ano	Comprimento do pêlo
<b><i>D.immitis</i></b>	<i>p</i> =0,714	<i>p</i> =0,503	<i>p</i> =0,959

Verificou-se não existir associação estatisticamente significativa entre as variáveis idade, época do ano e comprimento do pêlo e a presença de *D. immitis* (tabela 24). Não foram observadas infecções em animais com idade inferior a 1 ano (tabela 23).

### 3.7.5. Pesquisa de larvas de *A. vasorum* pela técnica de Baermann

Não foram observadas larvas de *A. vasorum* nas fezes da amostra populacional (n=80), através da técnica de Baermann. Foram observados ovos de parasitas intestinais, detetados anteriormente pela técnica de Willis.

### 3.8. Pesquisa de parasitas intestinais

Verificou-se que 72,5% (58/80) apresentaram parasitas intestinais, nomeadamente nemátodes (52,5%), céstodes (13,75%) e protozoários (40,0%). Na tabela 25 estão mencionados os parasitas intestinais detetados, pelos métodos de Willis e de Ziehl-Neelsen, com respetivas frequências absolutas e prevalências.

Tabela 25: Frequência absoluta e prevalência (%) dos parasitas intestinais detetados pelas técnicas de Willis e Ziehl-Neelsen.

Parasita intestinal	Técnica utilizada	Frequência absoluta	Prevalência (%)
<b><i>Giardia</i> spp.</b>	Ziehl-Neelsen	26	32,50
<b><i>Uncinaria stenocephala</i></b>	Willis	13	16,25
<b><i>Ancylostoma caninum</i></b>	Willis	12	15,00
<b><i>Toxocara canis</i></b>	Willis	12	15,00
<b><i>Trichuris vulpis</i></b>	Willis	9	11,25
<b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b>	Ziehl-Neelsen	9	11,25
<b><i>Taenia</i> spp.</b>	Willis	8	10,00
<b><i>Strongyloides stercoralis</i></b>	Willis	6	7,50

Pela técnica de Willis foram identificados os ovos observados na figura 11, e, utilizando-se a técnica de técnica de Ziehl-Nielsen, foram observados os protozoários intestinais identificados na figura 13. Foram ainda observados através de exame visual macroscópico de fezes frescas, proglotes de *D. caninum* (figura 10 C) em 3,75% (3/80) dos animais e parasitas adultos de *T. canis* (figura 9) e *Taenia* spp. (figura 10 A), ambos num mesmo animal. Após esmagamento de um segmento da *Taenia* spp. (figura 10 A), foi possível observar os ovos representados na figura 10 B.



Figura 11: Ovos de parasitas intestinais, ampliação de 400 x: (A) *Toxocara canis*, (B) *Strongyloides stercoralis*; (C) *Uncinaria stenocephala*; (D) *Ancylostoma caninum*; (E) *Trichuris vulpis*; (F) *Taenia* spp. (originais).

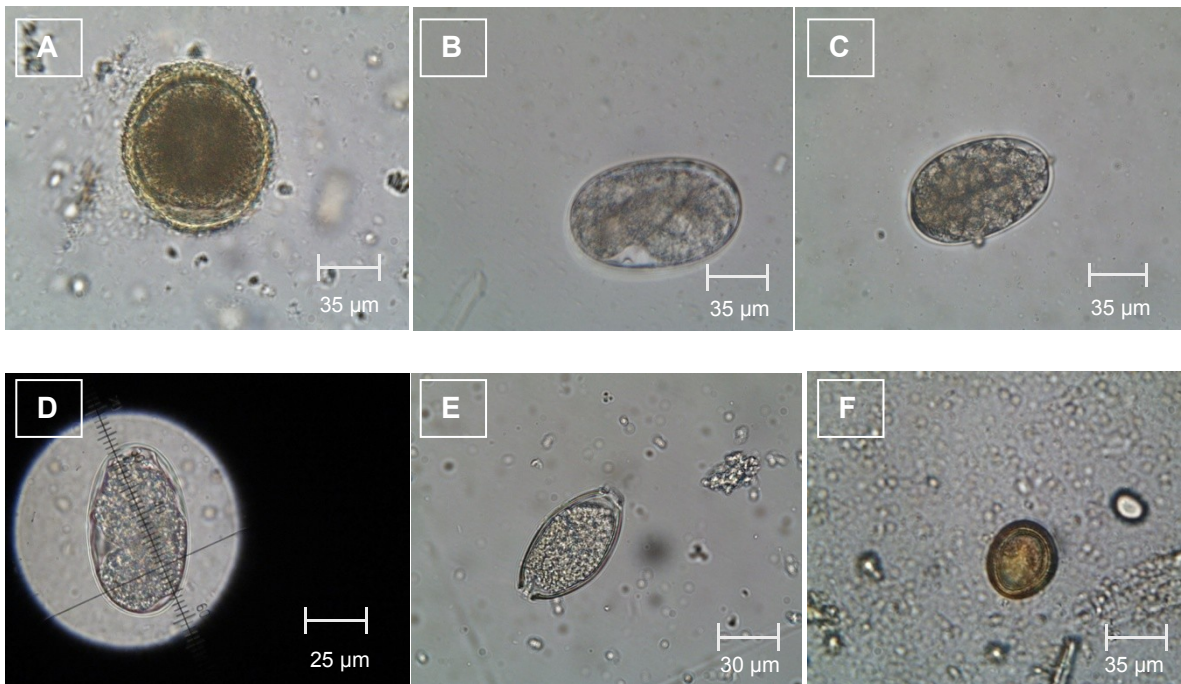


Figura 12: Fotografias de parasitas adultos: (A) Aspetto de lábios de *Toxocara canis*; (B) Aspetto de cauda de *Toxocara canis* (originais).

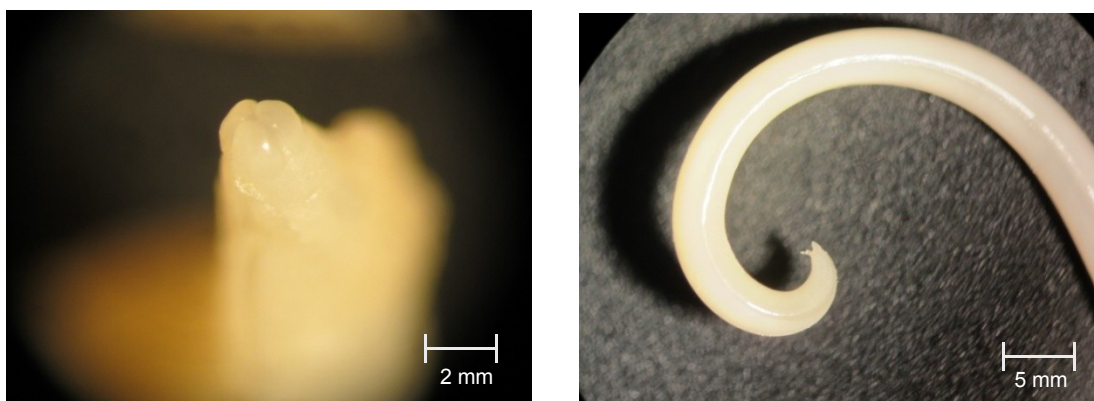


Figura 13: Fotografias (A) *Taenia* sp.; (B) Ovos de *Taenia* spp., após abertura de um segmento de parasita adulto e observação direta ao M.O; (C) proglote de *Dipylidium caninum* (originais).

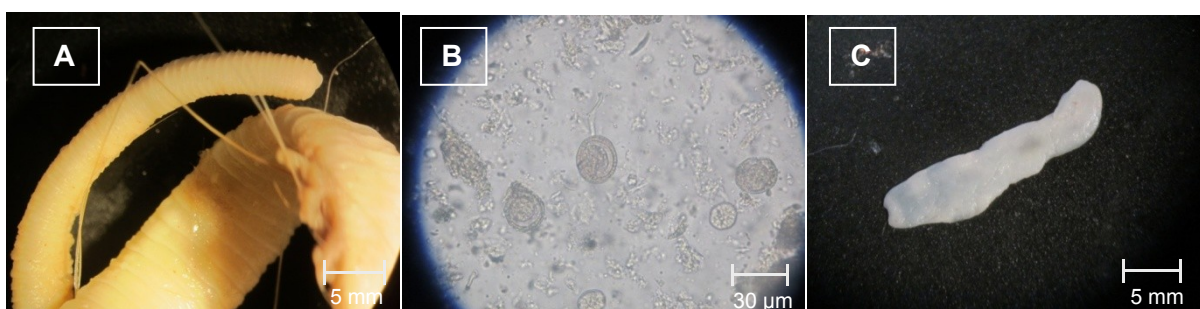
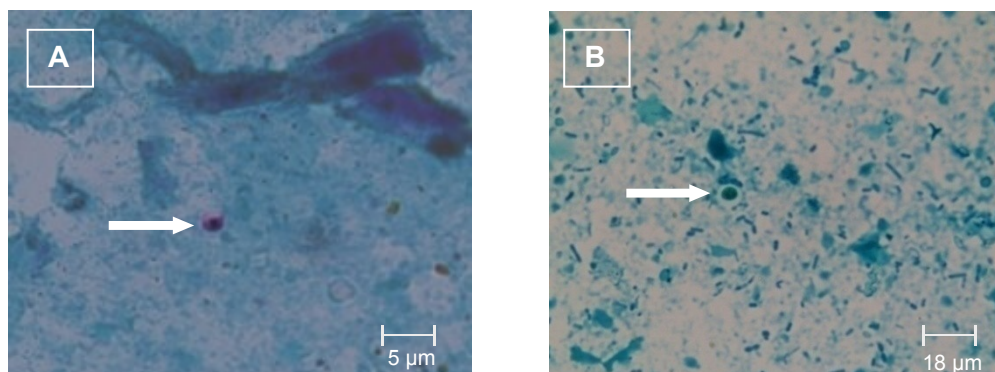
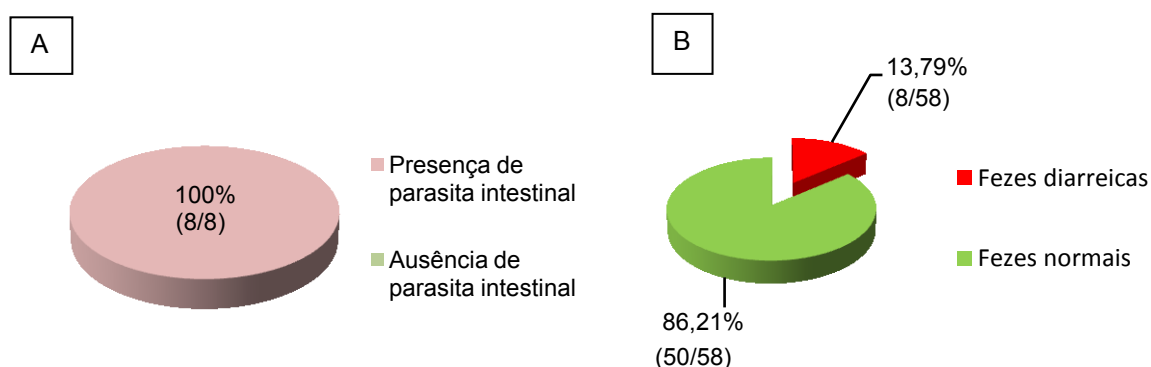


Figura 14: Oocisto de *Cryptosporidium* sp. (A) e quisto de *Giardia* sp. (B) em esfregaços de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (originais).



De seguida relacionaram-se os animais que apresentaram fezes diarreicas (n=8) e presença/ausência de parasita intestinal (gráfico 8A) e, ainda, os animais em que se detetaram parasitas intestinais e apresentaram fezes diarreicas ou normais (gráfico 8B).

Gráfico 8: A) Animais com fezes diarreicas (n=8) e presença/ausência de parasitas; B) animais com parasitas (n=58) e presença/ausência de fezes diarreicas.



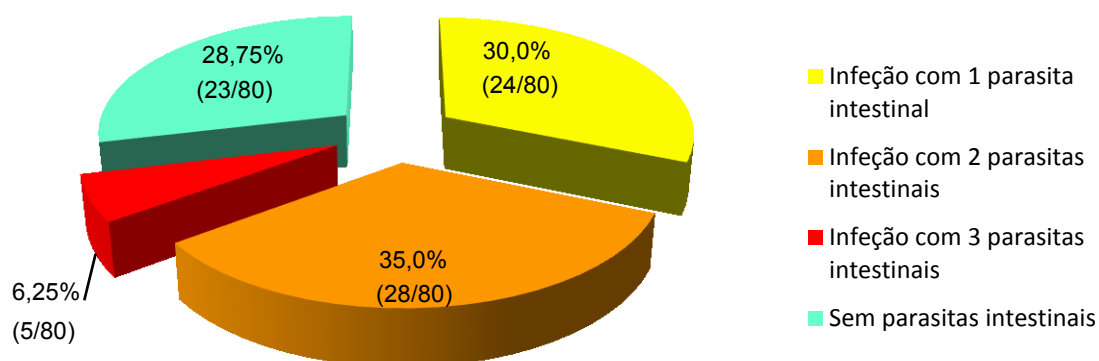
Observando o gráfico 8A, constatou-se que em 100% (8/8) dos animais que entraram no canil municipal, apresentando fezes diarreicas, foram detetados pelo menos um parasita intestinal. No entanto, de todos os animais que apresentaram um parasita intestinal (n=58), apenas 13,79% (8/58) apresentavam fezes diarreicas (gráfico 8B).

De referir que 3 animais (ID-19, ID-52 e ID-70) apresentaram um número elevado de eosinófilos por observação em esfregaço sanguíneo. No animal ID-19 foi observado quistos de *Giardia* spp., no animal ID-52, a presença de ovos de *A. caninum*, quistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, no animal ID-70, a presença de ovos de *U. stenocephala* e *T. canis*.

### 3.8.1. Co-infecções parasitárias intestinais

Foram observadas infecções parasitárias intestinais mistas em 41,25% (33/80) dos animais, sendo que 35% (28/80) apresentaram infecção por dois parasitas e 6,25% (5/80) apresentaram infecção por três parasitas (gráfico 9).

Gráfico 9: Proporção de co-infecções parasitárias intestinais, infecções únicas e ausência de parasitas (n=80).



Tendo em conta os 3 grupos parasitários intestinais estudados (nemátodes, céstodes e protozoários), verificaram-se as infecções e co-infecções mencionadas na tabela 26. Tendo em conta as espécies parasitárias intestinais foram observadas as co-infecções referidas na tabela 27.

Tabela 26: Número de animais parasitados e respetivas prevalências, co-infecções e respetivas prevalências, por grupo de parasitas intestinais, na amostra em estudo (n=80).

Grupo de parasitas intestinais	Frequência absoluta	Prevalência (%)	Número de co-infecções	Prevalência de co-infecções (%)
<b>Nemátodes</b>	42	52,50	10	12,5
<b>Céstodes</b>	11	13,75	0	0,00
<b>Protozoários</b>	32	40,00	3	3,75

Como observado na tabela 26, o grupo dos nemátodes é aquele que apresentou maior número de infecções (n=42), tendo sido observado em mais de 10 animais a presença de mais de uma espécie deste grupo parasitário. Seguiu-se o grupo dos protozoários (n=32), tendo-se observado a presença de mais de uma espécie de protozoários em 3 animais. Foram observados céstodes em 11 animais.

Tabela 27: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias intestinais mistas na amostra populacional (n=80).

Parasitas Intestinais	Frequência absoluta	Prevalência (%)
<i>Giardia</i> spp. + <i>T. canis</i>	5	6,25
<i>Giardia</i> spp. + <i>A. caninum</i>	4	5,00
<i>Giardia</i> spp. + <i>U. stenocephala</i>	3	3,75
<i>T. canis</i> + <i>U. stenocephala</i>	3	3,75
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	2	2,50
<i>Giardia</i> spp. + <i>Taenia</i> spp.	2	2,50
<i>Giardia</i> spp. + <i>T. vulpis</i> + <i>A. caninum</i>	2	2,50
<i>Giardia</i> spp. + <i>S. stercoralis</i>	1	1,25
<i>Giardia</i> spp. + <i>T. vulpis</i>	1	1,25
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>U. stenocephala</i>	1	1,25
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>A. caninum</i>	1	1,25
<i>T. canis</i> + <i>S. stercoralis</i>	1	1,25
<i>T. canis</i> + <i>T. vulpis</i>	1	1,25
<i>S. stercoralis</i> + <i>Taenia</i> spp.	1	1,25
<i>S. stercoralis</i> + <i>T. vulpis</i>	1	1,25
<i>A. caninum</i> + <i>U. stenocephala</i>	1	1,25
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>A. caninum</i>	1	1,25
<i>Giardia</i> spp. + <i>U. stenocephala</i> + <i>Taenia</i> spp.	1	1,25
<i>A. caninum</i> + <i>U. stenocephala</i> + <i>Taenia</i> spp.	1	1,25

### 3.8.2. Influência de fatores

Estudou-se a infecção por parasitas intestinais de acordo com o respectivo grupo (nemátodes, céstodes e protozoários), tendo em conta as variáveis globais como a grupo etário, época do ano e sexo, conforme tabelas 28, 29 e 30.

Tabela 28: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por grupo etário, na amostra populacional (n=80).

Parasitas intestinais	Grupo etário	Cães (n)	Frequência absoluta	Prevalência (%)	Associação estatística
Nemátodes	<1	11	7	63,64	<b>p = 0,002</b>
	[1; 3[	26	17	65,38	
	[3; 7[	19	9	47,37	
	≥ 7	24	8	33,33	
Céstodes	<1	11	1	9,09	<b>p = 0,783</b>
	[1; 3[	26	2	7,69	
	[3; 7[	19	3	15,79	
	≥ 7	24	5	20,83	
Protozoários	<1	11	4	36,36	<b>p = 0,465</b>
	[1; 3[	26	11	42,31	
	[3; 7[	19	10	52,63	
	≥ 7	24	7	29,17	

Tabela 29: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por época do ano, na amostra populacional (n=80).

Parasitas intestinais	Época do ano	Cães (n)	Frequência absoluta	Prevalência (%)	Associação estatística
Nemátodes	Out – Dez	14	6	42,86	<b>p = 0,829</b>
	Jan – Mar	26	15	57,69	
	Abr – Jun	18	9	50,00	
	Jul – Set	22	12	54,54	
Céstodes	Out – Dez	14	2	14,29	<b>p = 0,982</b>
	Jan – Mar	26	4	15,38	
	Abr – Jun	18	2	11,11	
	Jul – Set	22	3	13,63	
Protozoários	Out – Dez	14	8	57,14	<b>p = 0,112</b>
	Jan – Mar	26	7	26,92	
	Abr – Jun	18	10	55,56	
	Jul – Set	22	7	31,82	

Gráfico 10: Prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por época do ano, na amostra populacional (n=80).

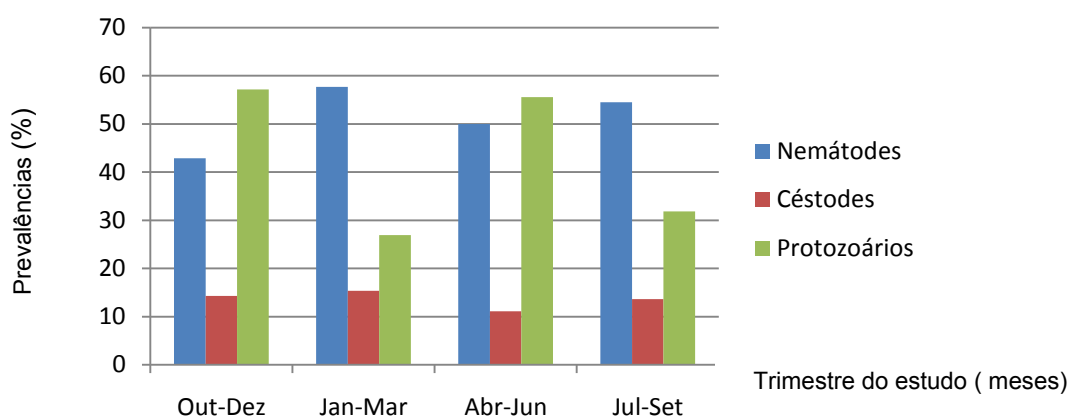


Tabela 30: Frequência absoluta e prevalência (%) de animais com infecções parasitárias de nemátodes, céstodes e protozoários por sexo, na amostra populacional (n=80).

Parasitas intestinais	Sexo	Cães (n)	Frequência absoluta	Prevalência (%)	Associação estatística
Nemátodes	Masculino	47	22	46,81	$p = 0,224$
	Feminino	33	20	60,61	
Céstodes	Masculino	47	8	17,02	$p = 0,311$
	Feminino	33	3	9,09	
Protozoários	Masculino	47	19	40,43	$p = 0,926$
	Feminino	33	13	39,39	

Dos vários fatores avaliados, apenas no grupo dos nemátodes e, na variável “grupo etário” (tabela 28), verificou-se uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ). De acordo com o observado na tabela 28, os grupos etários que apresentam maior infecção por nemátodes são o correspondente aos animais em crescimento (até 1 ano) e o dos jovens adultos (1 a 3 anos), com prevalências de 63,64 % e 69,23 %, respectivamente.

Apesar da inexistência de associações estatisticamente significativas entre ter infecção parasitária intestinal e a variável época do ano, foram constatadas prevalências superiores de infecção por protozoários intestinais, nos meses de outubro/dezembro e abril/junho, sendo, respectivamente, de 57,14% e de 55,56%. Constatou-se ainda, que os indivíduos do sexo feminino têm maior prevalência de infecção por nemátodes (60,61%).

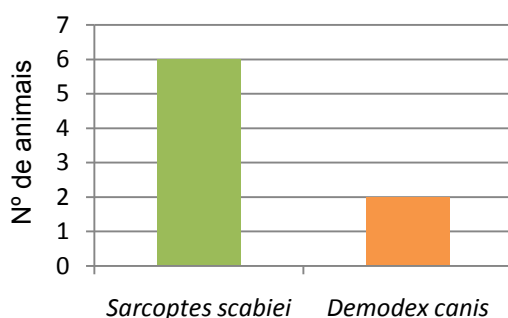


### 3.9. Detecção de ectoparasitas

#### 3.9.1. Raspagem cutânea

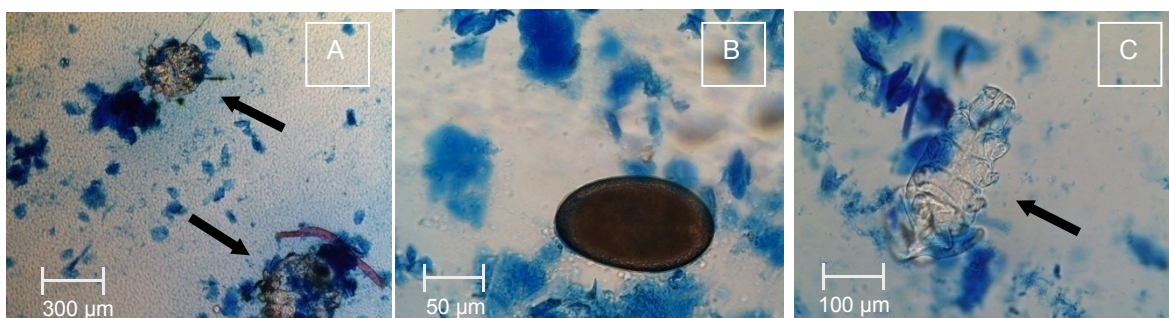
Da amostra em que se efetuou raspagem cutânea (n=20), correspondente aos animais com lesões na pele, observou-se que 35,0% (7/20) apresentavam infestação por ácaros. As espécies de ácaros encontradas, por raspagem cutânea e número de animais acometidos, encontram-se mencionadas no gráfico 11.

Gráfico 11: Número de animais que apresentaram ácaros na amostra populacional em que efetuou raspagem cutânea (n=20).



Dos resultados obtidos (gráfico 11), verificou-se que 30,0% (6/20) dos animais apresentaram infestação por *S. scabiei* (figura 15A e 15B) e 10,0% (2/20) apresentaram infestação por *D. canis* (figura 15C). Foi ainda observado que um animal (ID-72) apresentou, em simultâneo, *S. scabiei* e *D. canis*. Este animal tinha 8 meses de idade e apresentava sinais de alopecia generalizada, descamação, eritema e prurido. Foi, ainda, observado, acidentalmente, ao microscópio óptico, ovos de *Toxocara canis* na raspagem cutânea de um animal (ID-21), ao qual já havia sido detetado pelo método de Willis.

Figura 15: (A) *Sarcoptes scabiei*, após esclarecimento com lactofenol azul; (B) ovo de *Sarcoptes scabiei*, após esclarecimento com lactofenol azul; (C) *Demodex canis*, após esclarecimento com lactofenol azul (originais).



### 3.9.2. Colheita de cerúmen

Não foram observados ácaros ao microscópio ótico, no conteúdo resultante das colheitas auriculares, efetuadas na amostra populacional (n=80).

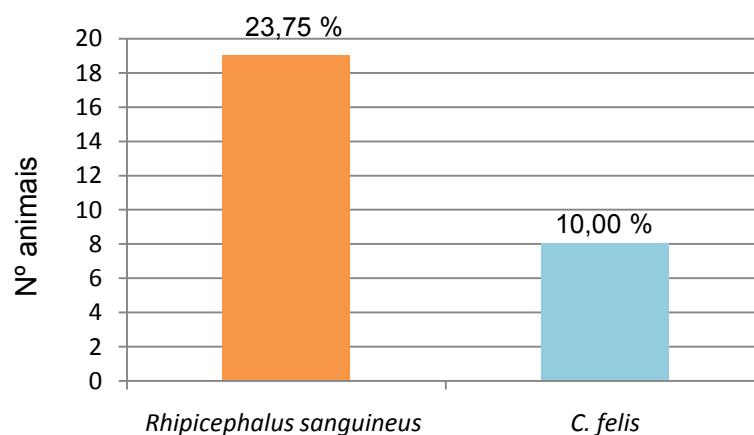
### 3.9.3. Escovagem do pêlo

Não foram observados ácaros ao microscópio ótico, no conteúdo resultante das escovagens, efetuadas na amostra de animais que apresentava descamação (n=12).

### 3.9.4. Colheita de ectoparasitas macroscópicos

Foram observados ectoparasitas em 31,25% (25/80) da amostra populacional. A observação ao microscópio estereoscópico permitiu identificar os ectoparasitas, conforme gráfico 12 e figuras 13 e 14.

Gráfico 12: Número e prevalências de ectoparasitas identificados ao microscópio estereoscópico, na amostra populacional (n=80).



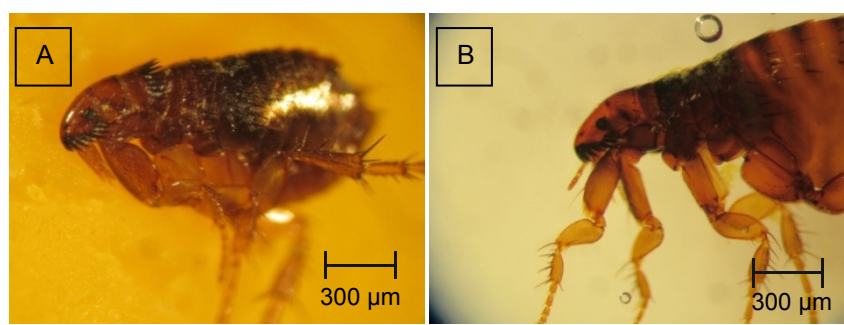
Foi observado infestação por *R. sanguineus* em 23,75% (19/80) e por *C. felis* em 10,0% (8/80) da amostra populacional. Verificou-se ainda, que, 2 animais apresentaram simultaneamente, *R. sanguineus* e *C. felis*.



Figura 16: (A) *Rhipicephalus sanguineus* macho à esquerda e fêmea à direita; (B) base do capítulo em hexágono de *R. sanguineus* macho; (C) *R. sanguineus*: poro anal com sulco anal, contornando o ânus posteriormente (fêmea) (originais).



Figura 17: (A) *Ctenocephalides felis*, observação em microscópio estereoscópico; (B) *Ctenocephalides felis*, observação em M.O. (originais).



### 3.9.4.1 Influência de fatores

Estudou-se a variável época do ano, apenas para a presença de ixodídeos e pulgas, uma vez que no caso dos ácaros não se efetuou a detecção em todos os animais da amostra populacional. Assim, a tabela 31 mostra as respectivas frequências absolutas e relativas e associação estatística.

Tabela 31: Frequência absoluta, frequência relativa (%) e associação estatística entre a presença de *R. sanguineus* e *C. felis* e a época do ano.

Espécie	Época do ano	Amostra (n)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Associação estatística
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Out – Dez	14	0	0,00	<b>p=0,026</b>
	Jan – Mar	26	4	15,38	
	Abr – Jun	18	9	50,00	
	Jul – Set	22	6	27,27	
<i>Ctenocephalides felis</i>	Out – Dez	14	0	0,00	<b>p=0,479</b>
	Jan – Mar	26	2	7,69	
	Abr – Jun	18	4	22,22	
	Jul – Set	22	2	9,09	

De acordo com a tabela 31 foi verificada a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a presença de *R. sanguineus* e a época do ano, observando-se que esta espécie não foi detetada no período de outubro a dezembro e, foi detetada, principalmente, nos meses de abril a junho, com uma prevalência de 50,0% (9/18), seguindo-se o período de julho a setembro (27,27%) e depois, janeiro a março (15,38%).

No entanto, efetuando-se a divisão dos meses, conforme a tabela 32 e, estudando a prevalência de *R. sanguineus*, verificou-se uma associação estatisticamente muito significativa entre a presença de *R. sanguineus* e os meses do ano ( $p=0,002$ ), com prevalências elevadas nos meses de março / abril (55,0%) e julho / agosto (45,45%). Observou-se ainda a inexistência de *R. sanguineus* nos meses de novembro a fevereiro.

Tabela 32: Frequência absoluta, frequência relativa (%) e associação estatística entre a presença de *R. sanguineus* e a variável meses do ano.

Espécie	Meses do ano	Amostra (n)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Associação estatística
<b><i>Rhipicephalus sanguineus</i></b>	Set - Out	13	1	7,69	<b><math>p=0,002</math></b>
	Nov-Dez	12	0	0,00	
	Jan-Fev	18	0	0,00	
	Mar-Abr	20	11	55,00	
	Mai-Jun	6	2	33,33	
	Jul – Ago	11	5	45,45	

#### 4. Discussão

O principal objetivo do estudo foi determinar a prevalência de algumas espécies de parasitas importantes nos cães e, com relevância em Saúde Pública, tendo como população-alvo os cães errantes capturados pelo canil municipal de Vila Franca de Xira. Pela dificuldade de execução, poucos estudos têm sido desenvolvidos nesta população, em Portugal e, um pouco por todo mundo. Em Portugal, foram realizados estudos sobre hemoparasitas por Silva (2011) e sobre parasitas gastrointestinais por Lebre (2011) em canis municipais. A população canina errante, é elevada, apesar de não se conhecer ao certo o número, que é de difícil estimativa, o que dificulta o conhecimento exato dos riscos zoonóticos e a implementação de medidas de controlo.

##### 4.1. Caracterização da amostra

A amostra populacional do estudo foi composta apenas por 80 animais, contudo, caracteriza bem a população canina errante do concelho de Vila Franca de Xira, uma vez que encontram-se representadas todas as freguesias do concelho. A amostra corresponde a 2,51 % dos animais licenciados no concelho ( $n=3184$ ), apesar de não fazer parte desta população, uma vez que não

possuem proprietário. Estima-se que o número de canídeos nas freguesias do concelho de Vila Franca de Xira seja superior a 3184 (número fornecido pelas juntas de freguesia em 2011), pois muitas pessoas não registam e licenciam os seus cães, apesar de ser obrigatório de acordo com a legislação vigente. Relativamente aos animais capturados e incluídos no estudo, verificaram-se mais animais do sexo masculino ( $n=47$ ) do que do feminino ( $n=33$ ), não sendo esta diferença significativa. Poderá contudo, ser explicada pelo facto do canil municipal receber mais solicitações de captura de animais do sexo masculino, provavelmente por apresentarem maior incidência de comportamentos agressivos (Lund, Agger & Vestergaard, 1996). Quando se refere que nenhum dos animais se encontrava esterilizado, levantam-se algumas dúvidas no caso das fêmeas. Apesar de nenhum dos animais deste sexo, apresentar incisão abdominal compatível com abertura prévia desta cavidade, não significa que não se possam encontrar estéreis. Não se efetuou nenhum exame imagiológico para confirmação de presença/ausência de órgãos reprodutores, nem da sua funcionalidade. Também nada se sabe da possibilidade de esterilização química das fêmeas. Nos machos, apesar de todos terem apresentado ambos os testículos palpáveis, não se sabe se estes encontravam-se ou não funcionais. No caso das fêmeas, o número destas que foram capturadas em gestação (12,12%) e lactação (9,06%) é perfeitamente normal, uma vez que, por um lado, são mais frequentemente reportadas aos serviços municipais, por outro lado, concedem menos resistência no ato de captura. No que se refere às idades, a idade mínima (3 meses) deve-se ao facto não terem sido incluídos no estudo, animais em lactação e o desmame dos cachorros oriundos de fêmeas errantes, ocorrer muito precocemente ou muito tardiamente. Quando o desmame é precoce, por imposição, imaturidade e desatenção da mãe, os cachorros têm imensa dificuldade em sobreviver, constituindo uma subpopulação que é desconhecida. Quando o desmame é tardio, por excessiva proteção materna, o desmame é concretizado quando já não existe produção de leite suficiente. É por isso, muito difícil encontrar-se animais com 2 meses de idade na população canina errante, sem a presença da mãe. A amostra populacional encontra-se também, bem representada no fator idade, uma vez que apresenta todas as faixas etárias, havendo contudo maior prevalência de jovens adultos (de 1 até 3 anos) e idosos (maior de 7 anos), sendo estas faixas etárias, reconhecidas como as que preferencialmente levam ao abandono, uma vez que representam as principais causas de abandono: inadaptação/desilusão em relação ao animal, consciencialização das obrigações legais e morais e problemas de saúde. De salientar que a moda foi de 2 anos de idade, representada por 18 indivíduos da amostra. Relativamente às raças dos animais da amostra, também se verificou representar adequadamente a população canina errante de Vila Franca de Xira, uma vez que foi composta maioritariamente por animais de raça indefinida (46,25%), sendo as raças identificadas, correspondentes a raças potencialmente perigosas e de caça, reconhecidas como as mais frequentemente abandonadas. As raças potencialmente perigosas são abandonadas, principalmente pelo medo que a própria família tem do animal quando na faixa etária de adulto. As raças de caça por inaptação do animal à função e desilusão do dono quanto à expectativa criada. Também são identificadas algumas raças de guarda, devido a alguns animais incluídos nestas, tornarem-se, a dado momento, perigosos para o dono ou ainda, por na sua maioria defenderem terrenos com grande extensão e conseguirem fugir destas propriedades. Relativamente ao porte do animal, verifica-se que

a população canina errante de Vila Franca de Xira é, principalmente, composta por cães de porte médio (45,00%) e grande (38,75%), pois por um lado são os que causam maior desilusão ao crescerem muito acima das expectativas dos donos e, por outro lado, são os que necessitam de maior dispêndio de recursos financeiros na alimentação e medicamentos. A freguesia da Castanheira do Ribatejo, não sendo a freguesia do concelho de Vila Franca de Xira, com maior população, quer canina, quer humana, nem com maior área territorial, foi a freguesia onde foram capturados mais cães, pelo facto do canil municipal se localizar nesta freguesia, situando-se precisamente a poucos metros do extremo norte da freguesia e do concelho. Tal localização permite uma resposta mais eficiente, a solicitações de recolha de cães errantes, oriundos desta freguesia. O estudo decorreu durante 1 ano, permitindo avaliar a variável época do ano, na presença de várias infeções parasitárias, como abordado adiante.

#### **4.2. Clima**

Foi verificado que nos meses de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012 foram registados os menores valores de temperaturas máxima e mínima diária, variando dos 2,7°C aos 20,1°C. Contudo, estes meses também apresentaram precipitações máximas diárias baixas (até 10,7 mm), sendo de 0 mm no mês de fevereiro de 2012. Os meses de outubro de 2011, e de maio/setembro de 2012 apresentaram temperaturas máximas diárias acima dos 30 °C. O mês de novembro de 2011 foi o mês com maior precipitação máxima diária, seguindo-se o mês de outubro de 2011.

#### **4.3. Exame do estado geral**

Foi verificado que 62,5% dos animais da amostra encontravam-se com pelo menos um sinal de doença. Dado o elevado nível de ansiedade da maioria dos animais, pela captura e submissão ao Homem, não foi possível efetuar a todos, um exame de estado geral completo, pelo que alguns sinais clínicos poderão ter passado despercebidos. De acordo com os sinais observados, apenas 43,75% dos animais apresentam sinais clínicos compatíveis com a infeção parasitária, identificada pelos testes laboratoriais. Alerta-se para o facto de não terem sido, na maioria dos casos, relacionados os sinais clínicos com a presença de infeção, tendo-se, correlacionado apenas nos casos de infeção por *L. infantum* e por parasitas intestinais, como será discutido.

#### **4.4. Dados parasitológicos gerais**

De acordo com os resultados do estudo, todos os animais errantes (80/80) apresentaram ou tinham tido uma infeção parasitária, por serem positivos em pelo menos um dos testes realizados. No entanto, em apenas 93,75% (75/80) dos animais, foi detetada a presença de agente parasitário, no momento. Em 5 animais foram identificados apenas anticorpos contra agentes parasitários, não tendo sido identificadas infeções parasitárias ativas. De salientar que, no caso da pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum*, os animais positivos e, que, simultaneamente, apresentaram sinais clínicos sugestivos de leishmaniose foram considerados como possuindo a infeção parasitária ativa. O parasita *L. infantum* pode manter-se nas células-alvo por períodos mais ou menos longos, mesmo após tratamento. Desconhece-se quando foram os animais infetados e, se já foram submetidos a

algum tratamento. A presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose em animais positivos na titulação 1:80 permite concluir a presença de infecção ativa e doença.

Neste estudo foram detetados agentes parasitários zoonóticos como *L. infantum*, *D. immitis*, *T. canis*, *S. stercoralis*, *A. caninum*, *U. stenocephala*, *Taenia* sp., *D. caninum*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e, ainda, os ectoparasitas *S. scabiei*, *R. sanguineus* e *C. felis*, também capazes de infestar o Homem. Ainda, foram detetados anticorpos contra hemoparasitas zoonóticos como *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*.

#### 4.5. Detecção de *L. infantum* por IFI

A pesquisa de *L. infantum* por IFI é a técnica de referência segundo a OIE, pela sua elevada sensibilidade e especificidade (Gramiccia, 2011) e, permite detetar os animais portadores assintomáticos, o que é fundamental para conhecer a população “reservatório”. Neste estudo considerou-se o limiar de positividade de 1:80, tendo sido revelado uma seroprevalência de 28,75 % (23/80) nos animais errantes do concelho de Vila Franca de Xira. Também no concelho de Vila Franca de Xira, Faria (2008) detetou uma prevalência de 46% (23/50) de seropositividade a *Leishmania infantum*, em animais alojados num canil não oficial, localizado na mesma freguesia do canil oficial. No entanto, os animais foram submetidos ao rastreio após o alojamento (ao contrário deste estudo) e, o canil em causa não possuía qualquer plano de rastreio e profilaxia sanitária, tendo mesmo sido encerrado pela DGAV, por falta de condições sanitárias, pouco tempo após aquele estudo. Os animais poderão ter sido excessivamente expostos a vetores infectados, havendo uma disseminação da doença aos residentes.

No presente estudo, eliminou-se a variável “infecção ocorrida no interior do canil”, ocorrendo a recolha das amostras de sangue logo no período de alojamento dos animais. Este estudo, ao que se tenha conhecimento, é de todos os efectuados no concelho de Vila Franca de Xira, o mais fielmente representativo da população errante.

Outro estudo realizado também em canil não oficial em Setúbal, por Silva (2011), detetou uma seroprevalência de 16,25% (13/80). A prevalência obtida no presente estudo encontra-se em concordância com um estudo de Cortes *et al.* (2007), onde se verificou uma seroprevalência de 21,6 % (21/97) em cães errantes na região de Lisboa. Contudo, verifica-se em relação aquele estudo, um ligeiro aumento, que poderá dever-se a uma maior prevalência de *L. infantum* no concelho de Vila Franca de Xira comparativamente com outros concelhos da região de Lisboa, ou, poderá a doença estar a aumentar nesta população. Na região de Mafra, foi detetado por Armés (2010), uma seroprevalência de 8,75% (7/80) em cães assintomáticos. No nordeste de Portugal foi observada uma prevalência de 21,4% (140/654) por Sousa *et al.* (2011). Outros estudos recentes verificaram prevalências 6,31% (233/3974) em Portugal, sendo de 5,85% (42/773) no Distrito de Lisboa (Cortes *et al.*, 2012), referindo-se, no entanto, à população canina que frequenta os CAMV's (centros de atendimento médico-veterinário). Em Espanha foram observadas, em cães errantes, prevalências de 7,8% (141/1803) (Miró *et al.*, 2007a) e de 15,7 % (156/995) (Miró *et al.*, 2013).

Na década de 1980 existiam, em Portugal, três focos principais de infeção: região do Douro e Trás-dos-Montes, região de Lisboa e região do Algarve (Branco *et al.*, 2013), contudo tem-se verificado uma deslocação da infeção do litoral para o interior (risco de 2,43 vezes superior ao do litoral), com prevalências elevadas em Beja, Castelo Branco e Portalegre (Cortes *et al.*, 2012).

Em zonas endémicas, a população canina errante, é considerada muito relevante para a epidemiologia da doença, servindo muitas vezes de sentinelas (Miró *et al.*, 2007a). A população canina errante não só tem contribuído para a manutenção, como para o aumento de novas infeções, assim como tem favorecido a urbanização da LCan (Cortes *et al.*, 2007).

A prevalência de *L. infantum* pode, ainda assim, estar subestimada, por se ter utilizado apenas amostras de sangue para deteção de *L. infantum*. De acordo com Strauss-Ayali, Jaffe, Burshtain, Gonen & Baneth (2004), o sangue não é a melhor amostra, em comparação com a pele ou os linfonodos, não sendo, por vezes, suficiente para excluir a infeção. No presente estudo verificou-se que 82,61 % (19/23) dos animais positivos apresentaram sintomas, pelo que configura um fator relevante dado que os animais sintomáticos são, de acordo com Cortes *et al.* (2007), reservatórios provavelmente mais eficazes. No entanto, os cães assintomáticos podem constituir uma fonte de infeção para os vetores, tendo, por isso um importante papel na manutenção do ciclo de vida de *L. infantum* (Sousa *et al.*, 2011). No estudo de Miró *et al.* (2007a), em Espanha, apenas 24,8% (35/141) dos animais seropositivos a *L. infantum* apresentaram sintomatologia clínica, enquanto outro estudo efetuado também em Espanha, por Miró *et al.* (2013), verificou que 85,2% (133/156) dos animais seropositivos apresentavam sintomatologia, valor em concordância com o obtido neste estudo. Contudo, enquanto no estudo de Miró *et al.* (2007a) a população canina era errante, no de Miró *et al.* (2013), eram provenientes de CAMV's. Vários estudos efetuados em zonas endémicas estimaram que 50 a 60% dos cães seropositivos não apresentavam sinais de doença (Santos, Bacellar & Dumler, 2008). Ora, neste estudo apenas se verifica uma prevalência de 17,39 % de animais errantes capturados assintomáticos. A prevalência muito inferior de animais assintomáticos poderá ser explicada por se tratar de animais errantes, estando estes subnutridos e sem quaisquer cuidados médicos ou profiláticos, pelo que, associado ao facto de muitos possuírem infeções parasitárias concomitantes, poderão apresentar uma resposta imunitária inadequada e consecutivamente, um aumento de sinais clínicos. Neste estudo, os sinais observados foram: hiperqueratose (47,83%), perda de peso (43,48%), alopecia (39,13 %), descamação (39,13 %), onicogribose (26,09%), úlceras muco-cutâneas (26,09%), linfadenopatia (21,74%), debilidade muscular (21,74%), nódulos intra-dérmicos (13,04%) e dor articular (8,70%). Segundo um estudo de Cortes *et al.* (2012), os sinais mais observados foram lesões cutâneas (73,7%) e perda de peso (38,2%), sendo este último equivalente ao deste estudo (43,48%). A onicogribose, um sinal praticamente patognomónico, aparece em 19,7 % dos casos, segundo Cortes *et al.* (2012), ao passo que neste estudo foi de 26,09%.

A possibilidade de constituição de bancos de sangue para cães pela utilização de sangue recolhido em cães errantes deverá ser cuidadosamente avaliada, uma vez que *L. infantum* pode ser transmitido por transfusão sanguínea.

#### 4.5.1. Influência de fatores

Foi possível verificar, neste estudo, uma associação estatisticamente significativa entre a idade e a positividade à infeção por *L. infantum*. Tendo-se agrupado os animais nas faixas etárias inicialmente propostas, correspondentes a animais em crescimento, jovens adultos, adultos e idosos foi possível verificar que os animais adultos (de 3 a 7 anos) e idosos (mais de 7 anos) apresentam um risco superior de infeção. No entanto, tendo-se efetuado um reagrupamento de idades, verificou-se que o pico de infeção ocorre em animais dos 5 aos 11 anos ([5; 8[= 61,54%; [8; 11[= 76,92%). Um estudo de Cortes *et al.* (2012), identificou o pico de seropositivos na faixa etária dos 5 aos 8 anos (68,42%). No entanto, estudos de Solano-Gallego *et al.* (2011), verificaram uma distribuição bimodal, com maior prevalência em animais de idade inferior a 3 anos ou superior a 8 anos. De facto, os vários autores verificaram um risco muito superior de infeção em animais mais velhos, por exposições repetidas ao vetor (Miró *et al.*, 2007a; Cortes *et al.* 2012). O facto de, neste estudo, não ter sido detetado animais positivos mais de 11 anos poderá ser explicada por possível diminuição da resposta imunitária, ocorrida em idade avançada e, portanto, progressão rápida da doença, conduzindo à morte, antes da captura pelos serviços municipais. Contrariamente, poderá verificar-se a aquisição e resposta imunitária adequada após sucessivas exposições. Assim, os animais errantes do concelho de Vila Franca de Xira, com 5 ou mais anos de idade apresentam um risco 8,47 vezes superior a ser positivo a *L. infantum* do que os animais errantes com idade inferior a 5 anos. O facto de não terem sido detetados animais positivos com idade inferior a 1 ano, estará relacionado com o tempo necessário para o estabelecimento da infeção e da seroconversão, que mais dificilmente terá ocorrido em animais muito novos. Salieta-se a possibilidade de transmissão vertical, já comprovada (Masucci *et al.*, 2003; Boggiatto *et al.*, 2011; Naucke & Lorentz, 2012). Neste estudo, não foi possível verificar nem comprovar a possibilidade desta via de transmissão, uma vez que os animais muito novos foram todos seronegativos. A ausência de associação estatística entre os restantes fatores e a positividade a *L. infantum*, não significa que não exista uma influência desses fatores, mas apenas não se verificou neste estudo. Apesar das alimentações dos flebobomíneos, em Portugal, tenderem a ocorrer de maio a outubro, principalmente ao amanhecer e entardecer e, durante a noite (Afonso & Alves-Pires, 2008; Cortes *et al.*, 2012), é difícil associar a positividade de animais com *L. infantum* a uma determinada época do ano, uma vez que o período de seroconversão pode demorar de 1 a 22 meses (Oliva *et al.*, 2006). Acresce ainda, que, não se conhece o tempo de permanência dos animais errantes nas ruas nem quando tiveram início os sinais clínicos. Relativamente à influência do comprimento do pêlo, não foi observada uma diferença significativa entre esta variável e a prevalência de infeção por *L. infantum*. Estudos de Killick-Kendrick (1999), referem a preferência dos flebótomos para se alimentarem nas regiões com pouco pêlo dos animais, como orelhas, extremidade do focinho, etc., o que poderá explicar este resultado. Já outros autores identificaram um risco superior de infeção em animais de pêlo curto e médio (França-Silva *et al.*, 2003; Cortes *et al.*, 2012). Dado a elevada frequência de animais cruzados e de raça indeterminada, não se testou a possível influência do fator raça. No entanto, alguns autores identificaram algumas raças mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011) e outros verificaram menor susceptibilidade de raças portuguesas em relação às importadas (Pereira da Fonseca *et al.*, 2007).

#### 4.6. Detecção de hemoparasitas

A elevada prevalência de anticorpos anti-hemoparasitas detetados neste estudo reflete o elevado grau de infestação da população canina errante por vetores ixodídeos. Possivelmente, as infeções ativas mais graves levam o animal errante à morte, por falta de assistência médico-veterinária. As infeções menos graves e, debeladas pelo animal, são detetadas nos testes serológicos pela presença de anticorpos, durante vários anos. Vários autores, em diferentes países, verificaram as prevalências de hemoparasitas, através de diversos métodos de diagnóstico, encontrando-se alguns dos estudos mais recentes na tabela 34 (anexoVI).

##### 4.6.1. Detecção de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo

Neste estudo, não foram detetados hemoparasitas, através de observação de esfregaços sanguíneos. Apesar de rápida e económica, a deteção de hemoparasitas por este método origina muitos falsos negativos. A baixa sensibilidade desta técnica deve-se sobretudo a infeções subclínicas e crónicas e, à parasitémia ser normalmente baixa e intermitente (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). No caso de *E. canis* e *A. phagocytophilum*, a sensibilidade é ainda menor, uma vez que as mórulas intracitoplasmáticas são de difícil visualização em esfregaços sanguíneos, pelo que poder-se-ia aumentar o número de esfregaços de sangue para aumentar a sensibilidade (Harrus & Waner, 2011). No entanto, Kohn *et al.* (2011) identificaram 2,3% (12/522) de animais parasitados por *A. phagocytophilum*, na Alemanha.

Não foi observado a presença de *Hepatozoon canis* em esfregaços sanguíneos, apesar da sua identificação ser relativamente comum em países do sul da Europa, pela elevada prevalência do vetor *R. sanguineus* (Baneth, 2011; Otranto *et al.*, 2011; Gianelli *et al.*, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2012). Estudos, em Portugal, identificaram *H. canis* por observação de esfregaços sanguíneos: 2,1% (10/210) em Bragança (Figueiredo, 2008), 2,5% (2/80) no Distrito de Lisboa (Caeiros, 2012). Estudos de Otranto *et al.* (2011), em animais alojados num canil, no Sul de Itália, detetaram um surto de infeção por *H. canis* abrangendo 59% (49/83) da população canina jovem (menos de 18 meses de idade), utilizando-se uma combinação de testes citológicos e moleculares, sendo apenas 10,8% (9/83) identificados por citologia. Um outro estudo de Jittapalapong *et al.* (2006), em cães errantes, na Tailândia, verificou uma prevalência de 2,6% (8/308) de *H. canis* em observação microscópica de esfregaços de sangue e 11,4% (35/308) de DNA deste parasita utilizando-se a técnica PCR. A ausência de identificação de *H. canis* neste estudo poderá dever-se à pouca sensibilidade dos esfregaços de sangue, à parasitémia intermitente ou a sequestro de parasitas (merontes) nas vísceras (Mylonakis *et al.*, 2005). Para aumentar a sensibilidade de deteção deste parasita, poder-se-ia utilizar esfregaços sanguíneos preparados através de *buffy coat* ou efetuar-se a técnica de PCR. Contudo, a pesquisa de *H. canis* não era um dos objetivos do estudo, pela sua importância menor quer na saúde canina, quer como agente zoonótico. Também não foi observado *M. haemocanis* nos esfregaços de sangue observados. Contudo, a observação microscópica deste agente em esfregaços



de sangue periférico é pouco sensível (Pitorri *et al.*, 2012), podendo assim, encontrar-se subestimado. Para se aumentar a sensibilidade poder-se-ia efetuar a técnica PCR.

A eosinofilia observada em esfregaços sanguíneos de 3 animais poderá dever-se a infeção por helmintes e protozoários intestinais, como será discutido adiante.

#### **4.6.2. Detecção de hemoparasitas por IFI**

Foram detetados anticorpos contra hemoparasitas em 90,0% (72/80) dos animais, não se tendo contudo, verificado algum hemoparassita na observação microscópica de esfregaços sanguíneos. Esta diferença muito significativa de prevalências, deve ser avaliada com cautela, podendo dever-se a vários fatores: baixa sensibilidade daquele teste citológico, ao facto de nenhum dos animais se encontrar em fase de parasitémia, à presença de infeções antigas, à subjetividade de interpretação dos resultados e presença de possíveis reações cruzadas. Em zonas endémicas, os animais podem manter-se seropositivos durante muito tempo, mesmo após a eliminação do agente, devendo, por isso, o diagnóstico definitivo, ser também baseado na sintomatologia e alterações laboratoriais (Harrus & Waner, 2011, Solano-Galego & Baneth, 2011, Kohn *et al.*, 2011). O facto de se ter observado uma fraca positividade em testes IFI para os vários hemoparasitas, em muitos animais, vem reiterar a possibilidade de infeção antiga, com baixa titulação de anticorpos. No âmbito deste estudo, não foi possível verificar parâmetros laboratoriais devido a questões financeiras, embora esta informação pudesse ter sido muito útil. De facto, os animais errantes que desenvolvem uma hemoparasitose grave encontram-se desprotegidos e sem assistência médico-veterinária, podendo, por isso, morrer. Nos casos menos graves, o animal consegue debelar a infeção ou, pelo menos, conviver com a mesma, sendo seropositivo durante períodos mais ou menos longos. A maioria dos animais errantes em Vila Franca de Xira, encontrar-se-á nesta situação, ou seja, já foram, em alguma fase da vida infetados por um ou mais hemoparasitas, aos quais conseguiram debelar ou manterem-nos controlados de forma a não apresentarem sintomatologia clínica, muitas vezes por contatos sucessivos com os vetores e os agentes de CVBD's. Os casos graves, passarão despercebidos nesta população, causando a morte dos cães, mesmo antes da captura pelos serviços municipais.

Alguns dos estudos mais recentes de seroprevalências de CVBD encontram-se na tabela 34 (anexo VI). A seroprevalência de *B. canis* de 57,5 % (46/80), observada neste estudo, é das mais elevadas até agora detetadas. Em Portugal, foram detetadas prevalências de 61% (17/28) em Lisboa (Ferreira, 2008), 17,5% (14/80), no Distrito de Lisboa (Caeiros, 2012) e 20% (16/80) em Setúbal. Outros estudos com elevadas prevalências foram: 42,6%, no Brasil (Spolidorio *et al.*, 2013) e 70%, em Itália (Pennisi *et al.*, 2012), ambos pelo método IFI. No Brasil, a espécie identificada foi *B. vogeli*. É possível a seroprevalência de *B. canis* encontrar-se sobrestimada, uma vez que os resultados falsos positivos podem ocorrer em áreas endémicas, onde ocorre a produção de anticorpos, sem a ocorrência de doença (Ayoob *et al.*, 2010). Podem, ainda, ser devido a reacções cruzadas que podem ocorrer entre *B. canis*, *B. gibsoni*, *Toxoplasma* spp. e *Neospora* spp. (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Galego & Baneth, 2011).

O kit comercial da Megacor para a deteção de *B. canis* não distingue *B. canis*, de *B. vogeli* e *B. rossi*, reclassificadas recentemente e, outrora consideradas subespécies. Contudo, quer pela prevalência de *R. sanguineus*, quer pelo elevado número de assintomáticos, supõe-se que na maioria das infeções esteja presente a espécie *B. vogeli*. Isto porque, em Portugal, *B. canis* é encontrado maioritariamente no norte e *B. vogeli* no sul. A justificação da elevada prevalência de *B. canis* no norte, prende-se com as elevadas prevalências da espécie parasitária ou do seu vetor (*Dermacentor reticulatus*), ou pela sua maior virulência levando a maior número de diagnósticos (Cardoso *et al.*, 2010). A transmissão de *B. canis* e de *B. vogeli* é efetuada por ixodídeos, não estando a população canina errante protegida contra estes vetores. No entanto, Pennisi *et al.*, (2012) sugerem que possa haver outra via de transmissão, como acontece com *B. gibsoni* (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Banneth, 2011), uma vez que foi detetada, em Itália, uma elevada prevalência em animais de canil, que realizam frequentemente tratamentos contra os vetores, ao contrário do observado para *E. canis* e *A. phagocytophilum*.

Relativamente a *A. phagocytophilum* foi verificada uma seroprevalência de 34,0% (28/80), valor este superior a 17,6% (83/473) em Bragança (Figueiredo, 2008), 12,5% (10/80) em Setúbal (Silva, 2011), 18,7% (17/80) no Distrito de Lisboa (Caeiros, 2012). Outro estudo recente, realizado em Portugal por Cardoso *et al.* (2012), identificou prevalências de 4,5% (25/557) em animais saudáveis e 9,2% (58/628) em animais suspeitos. O valor obtido no presente estudo foi concordante com o de 34,1% (28/82) detetado na Rússia, em cães não tratados (Volgina, Romashov, Romashova & Shtannikov, 2013). No entanto, foram detetadas, na Europa, seroprevalências superiores: 38% (95/249) em Itália (Pennisi *et al.*, 2012), 43,3% (226/522) na Alemanha (Kohn *et al.*, 2011) e 54,5% (30/55) em Portugal (Santos *et al.*, 2009). A seroprevalência de *A. phagocytophilum* pode encontrar-se sobrestimada, uma vez que podem existir reações cruzadas, nomeadamente com *A. platys*, *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chafeensis* (Kohn *et al.*, 2011), sendo que os dois primeiros agentes existem em Portugal. Na Sicília (Itália) foram reportadas prevalências de 45% (39/87) (Torina *et al.*, 2007) em testes serológicos, mas nenhum detetado por PCR, assim como de la Fuente *et al.* (2006b) detetaram, na mesma região, uma prevalência de 4% (14/344), mas todos positivos a *A. platys*, por PCR. Também em Portugal, Santos *et al.* (2009) detetaram uma seroprevalência de 54,5% (30/55) pelo teste IFI e 0% pelo teste PCR. Neste estudo não foram observadas mórulas de *A. phagocytophilum* em neutrófilos circulantes. Contudo, na Alemanha, Kohn *et al.*, (2011), identificaram mórulas em neutrófilos de 2,3% (12/522) dos animais.

*A. phagocytophilum* foi, a par com *E. canis*, o agente menos detetado. Tal pode dever-se aos vetores, em Portugal, serem as espécies *Ixodes ricinus* e *I. ventralloi* (Santos *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2012), que são pouco prevalentes, ao contrário de *R. sanguineus*, que tem elevada prevalência e é o principal agente transmissor de *B. vogeli*, *E. canis* e *R. conorii*. De acordo com os resultados deste estudo, não foram detetados os vetores *I. ricinus* e *I. ventralloi* na amostra populacional.

A seroprevalência de 34,0% (29/80) de *E. canis* detetada neste estudo é concordante com 39% (11/28) detetado por Ferreira (2008) em Lisboa, sendo no entanto superior a outros estudos realizados em Portugal, como: 4,1% (23/557) detetado em cães saudáveis e 16,4% (103/628)

detetado em cães suspeitos em Portugal, por Cardoso *et al.*, (2012), ou 4,8% (4/80) no Distrito de Lisboa (Caeiros, 2012), 14,8% (70/473) em Bragança (Figueiredo, 2008) e 16,25% (13/80) em Setúbal (Silva, 2011). É ainda superior a outros estudos: 5% (55/1100) em Espanha (Miró *et al.*, 2013) e 16,2% (21/129) no Brasil (Spolidorio *et al.*, 2013). Contudo, é um valor inferior a 46% (119/249) detetado na Itália por Pennisi *et al.* (2012) e a 70,9% (227/320) de deteção de *Ehrlichia* spp., no Brasil (Melo *et al.*, 2011). As seroprevalências de *E. canis* e *A. phagocytophilum* detetadas neste estudo foram semelhantes. Contudo, para além da possível sobrestimação da seroprevalência de *A. phagocytophilum*, anteriormente referida, poderá ocorrer uma subestimação de *E. canis*, uma vez que a erlichiose monocítica canina é uma doença potencialmente mais grave que a anaplasose granulocítica canina, pelo que conduz à morte em mais casos. Sendo este estudo, efetuado na população canina errante, esses casos fatais passarão despercebidos e, não sendo contabilizados, fazem baixar o valor da respetiva prevalência. Por outro lado, os anticorpos anti-*E. canis* IgG persistem durante vários meses após a eliminação da bactéria (Harrus & Waner, 2011). Por sua vez, *A. phagocytophilum*, causa, frequentemente, infeções subclínicas (Ebani *et al.*, 2013).

O teste IFI para *E. canis* não consegue diferenciar esta espécie, das espécies *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* e, apresenta reacção-cruzada com *A. phagocytophilum* (Harrus & Waner, 2011).

No que respeita a *R. conorii*, foi observado uma seroprevalência de 76,2% (61/80), sendo a maior verificada neste estudo. Em Portugal, foram detetadas prevalências superiores de 87% (24/28), em Lisboa (Ferreira, 2008) e inferiores de 55,3% (261/473) em Bragança (Figueiredo, 2008), 55% (44/80) no Distrito de Lisboa (Caeiros, 2012) e 23,75% (19/80) em Setúbal (Silva, 2011). A prevalência obtida neste estudo, encontra-se em concordância com os estudos de Pennisi *et al.* (2012), onde foi detetada 72% (174/249) de seropositividade a *R. conorii*. Valores inferiores de 31,7% (41/129) foram detetados no Brasil, por Spolidorio *et al.*, (2013). A elevada prevalência de *R. conorii* é normal numa zona altamente endémica, como é conhecida a bacia do Mediterrâneo (Alexandre *et al.*, 2011; Socolovschi *et al.*, 2012). As elevadas prevalências de *R. conorii* poderão dever-se a fatores correlacionados com o hospedeiro invertebrado, nomeadamente, um elevado número de ixodídeos, as vias de transmissão transtadial e transovárica e o *cofeeding* (Levin *et al.* 2012) não sendo necessário, um hospedeiro vertebrado para a manutenção do ciclo de vida (Wallménius *et al.*, 2012). Contudo, a sua elevada prevalência pode ser, em parte, devida a reacções cruzadas (Pennisi *et al.*, 2012). De referir que, um estudo de Schicht *et al.* (2012), no Norte da Alemanha, revelaram que 33,3 % dos ixodídeos apresentavam-se infectados por *Rickettsia* spp.

Estudos efetuados em Portugal (Alexandre, 2005; Santos *et al.*, 2009; Silva, 2011; Caeiros, 2012; Cardoso *et al.*, 2012) revelaram prevalências inferiores para os diferentes hemoparasitas em estudo, podendo este facto dever-se à amostra populacional. De facto, espera-se que a população canina errante seja aquela que apresente maiores seroprevalências, uma vez que se encontra permanentemente no exterior, sem proteção contra os vetores e em frequente contato com outros animais errantes. Por outro lado, muitos desses estudos foram realizados noutras regiões do país, pelo que é possível obterem-se diferentes seroprevalências. Também, foram utilizadas diferentes titulações nesses estudos e, inclusivé, diferentes metodologias. Os testes serológicos positivos

podem não significar infeção, mas, apenas uma exposição prévia ao agente, dado o título de anticorpos manter-se por alguns meses. Para demonstrar infeção activa será necessário demonstrar um aumento de 4 vezes no título de anticorpos durante 4 semanas (Carrade *et al* 2009).

As temperaturas elevadas registadas no Distrito de Lisboa, nos meses de outubro de 2011 e de Maio a setembro de 2012 e, moderadas nos meses de março e abril de 2012, foram propícias ao desenvolvimento de vetores, nomeadamente a espécie *R. sanguineus*, que se desenvolve bem a temperaturas entre 20 a 35 °C (Dantas-Torres, 2010b) e é o vetor de *B. vogeli*, *E. canis* e *R. conorii*.

#### **4.6.3. Co-infeções por hemoparasitas**

Foram detetadas co-infeções por hemoparasitas em 76,4% (61/80) dos animais, valor este que se encontra acima dos 57% (142/249) detetados por Pennisi *et al.* (2012). As co-infeções podem dever-se à transmissão de vários agentes pelo mesmo vetor (*R. sanguineus*). À semelhança dos estudos de Pennisi *et al.* (2012), as infeções mistas de *Babesia* spp. e *R. conorii* foram as mais prevalentes, ocorrendo em 21,5% (17/80) neste estudo e, em 20% (50/249) naquele, sendo ambos os hemoparasitas, os que, individualmente, apresentam maiores prevalências. A co-infeção por *Babesia* spp. e *E. canis* não foi detetada neste estudo. Zandvliet, Teske & Piek (2004) sugerem que a co-infeção com estes 2 agentes provoca uma anemia mais grave. Tal facto poderá provocar uma maior taxa de mortalidade e, portanto, levar à não deteção neste estudo. Por sua vez, Spolidorio *et al.* (2013) verificaram, no Brasil, maior prevalência de co-infeções de *E. canis* e *Rickettsia* spp., mas os vetores poderão incluir outras espécies, para além de *R. sanguineus*.

#### **4.6.4. Influência de fatores**

Não foi verificada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de ixodídeos, época do ano e idade e a seropositividade aos hemoparasitas. No entanto, a seroprevalência de *R. conorii* foi muito menor em animais com idade inferior a 1 ano, provavelmente por estes não terem sofrido uma menor exposição. Já *E. canis*, foi mais seroprevalente em animais com idades compreendidas entre 1 e 3 anos. Estudos de Ebani *et al.* (2013) verificaram que a seroprevalência de *A. phagocytophilum* era mais elevada em animais dos 6 aos 10 anos, enquanto René-Martellet *et al.* (2013), verificaram um risco superior de infeção por *B. canis* em animais até 5 anos, por passarem mais tempo no exterior e por apresentarem menor imunidade contra as espécies envolvidas.

Foi observada maior prevalência de *B. canis* nos animais capturados nos meses de outubro a dezembro. Contudo, o teste comercial utilizado não permite diferenciar as espécies de *Babesia*: *B. canis*, *B. vogeli* ou *B. rossi*. No caso de Portugal, apenas *B. canis* e *B. vogeli* foram encontradas, sendo transmitidas por *D. reticulatus* e *R. sanguineus*, respetivamente (Cardoso *et al.*, 2010). A espécie *R. sanguineus* necessita de temperaturas acima dos 20°C para o seu desenvolvimento, ou seja, é sazonal, encontrando-se mais, em Portugal, nos meses de primavera e verão. Assim, provavelmente a espécie de *Babesia* encontrada será *B. vogeli* (facto a necessitar de confirmação

através de estudos moleculares), tendo sido observada maior seroprevalência nos meses de outubro/dezembro.

O facto de não se ter verificado uma associação estatisticamente significativa entre a presença de ixodídeos e época do ano e a seropositividade aos agentes hemoparasitários, vem corroborar o referido, isto é, que as seroprevalências detetadas devem-se, na sua maioria, a infeções antigas. Contudo, apesar de não ser estatisticamente significativo, foram observadas menores seroprevalências nos animais sem infestação por ixodídeos, no momento de captura, do que nos animais que apresentaram ixodídeos, o que poderá dever-se ao tempo necessário para a seroconversão. O período de incubação é de 10 dias a 3 semanas para *B. canis* (Nelson & Couto, 2001), 1 a 2 semanas para *A. phagocytophilum* (Egenvall et al, 1998), 8 a 20 dias para *E. canis* (Baneth, 2010; Rar & Golovljova, 2011) e 3 a 7 dias para *R. conorii* (Figueiredo, 2008). De referir que, nenhum dos animais da amostra populacional possuía coleira insecticida e, não foi possível avaliar se o abandono teria sido recente ou não.

Se fossem avaliadas apenas as infeções ativas, verificaríamos uma influência dos fatores como a presença de ixodídeos e época do ano e a seropositividade, uma vez que *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*, são todos transmitidos por ixodídeos e o período de atividade destes vetores encontra-se dependente da época do ano, pelo que fatores como a não aplicação de ectoparasitocidas, carga parasitária, maior exposição ao exterior e condições climáticas (temperatura e humidade), podem ter influência na seroprevalência dos hemoparasitas estudados. Devido à existência de uma amostra reduzida em algumas freguesias (n=2 no Forte da Casa e Póvoa de Stª Iria; n=3 nas Cachoeiras e Calhandriz), não se verificou a influência da freguesia na presença de infeção por hemoparasitas. É possível que sejam detetadas diferenças, uma vez que existem freguesias urbanas e outras rurais e algumas mistas. Seriam necessários novos estudos, com uma amostra populacional maior, para se verificar as diferenças entre as várias freguesias. De qualquer modo, este fator deverá ser sempre avaliado cuidadosamente, pois a população canina errante não é estática, movimentando-se entre freguesias e concelhos limítrofes. Também a variável “raça” poderá influenciar a infeção por hemoparasitas, não tendo, no entanto, sido avaliado neste estudo, dada a elevada prevalência de animais sem raça definida. Os cães de caça e os de zonas rurais que se encontram muito expostos são animais com maior risco de infeção (Irwin, 2009).

#### **4.7. Detecção de parasitas dos aparelhos cardiovascular, respiratório e serosas**

##### **4.7.1. Detecção de *D. immitis* pelo teste rápido *Speed Diro***

A detecção de antígeno de *D. immitis* revelou uma prevalência de 12,2% (10/80). Este valor é superior a 3,6% (920/557) em Portugal e 2,4% (3/126) na região de Lisboa verificado por Cardoso *et al.* (2012), numa população-alvo aparentemente saudável. A prevalência observada é, também, superior a 2,1 % verificada no Norte e Centro Norte de Portugal, com maiores prevalências em Coimbra (8,8%) e em Aveiro (6,8%) (Balreira *et al.*, 2011, citado por Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012). No entanto, a seroprevalência observada é inferior a 15,1% (105/696)

detetada recentemente, na região Centro de Portugal, por (Alho *et al.*, 2013) e a 16,7% detetada na região do Ribatejo (Araújo, 1996, citado por Morchón *et al.*, 2012), tendo, neste último estudo, sido a segunda região do país com maior seroprevalência, apenas superada pela Ilha da Madeira com 30,0%. Foram detetadas prevalências de 1,5% (8/525) na Índia (Rani *et al.*, 2010), 5,47% (14/256) no Brasil (Reifur, Thomaz-Soccol & Montiani-Ferreira, 2004), 12,7% (67/528) na China (Liu, Yang, He, Yang & Sun, 2013) e de 19,36% (135/697) nas Canárias (Montoya-Alonso *et al.*, 2010) e 20,6% (71/344) no Taiwan (Yuasa *et al.*, 2012).

#### **4.7.2. Pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott modificada**

Neste estudo, foi observado uma prevalência total de microfilárias de 20,0% (16/80), valor muito semelhante ao de 17,9% (63/351) detetado em Itália por Cringoli, Rinaldi, Veneziano & Capelli (2001), pela utilização da mesma técnica. Foram observadas prevalências superiores de 33,3% (60/180) de microfilárias nos cães errantes, de Taiwan (Wang, 1997), pela técnica de Knott, mas 60,6% (109/180) por necrópsia.

Foram observadas as microfilárias de *D. immitis* em 10,0% (8/80) e *A. reconditum* em 11,25% (9/80) dos animais, sendo que um apresentou infecção mista. Valores superiores de 20,1% (38/180) de microfilárias de *D. immitis* foram detetados, também em animais errantes, de Taiwan, por Wang (1997). No entanto o mesmo autor identificou infecções em 55,0% (99/180) dos animais por necrópsia. Foram obtidas prevalências inferiores (3,5%) de microfilárias de *D. immitis* no Brasil (Reifur *et al.*, 2004). Este estudo verificou que 80,0% (8/10) dos animais infetados por *D. immitis* eram microfilarémicos, resultado este ligeiramente superior ao de 61,48% (83/135) obtido por Montoya-Alonso *et al.* (2010). A deteção de animais infetados por *D. immitis*, mas sem microfilárias, poderá ser devido a infecções pré-patentes, infecções unissexuais, inexistência de microfilarémia por mecanismos imuno-mediados (Simón *et al.*, 2009) ou a esterilização dos parasitas adultos induzida por medicamentos anti-parasitários (Pantchev, Etzold, Dauschies & Dyachenko, 2011). A prevalência de 11,25% (9/80) de *A. reconditum* observada neste estudo encontra-se em concordância com o valor de 12,2% (22/180) obtido também em cães errantes, em Taiwan (Wang, 1997). Foram obtidas, pela técnica de Knott modificada, prevalências de microfilárias de *A. reconditum* de 19,9% (51/256) (Reifur *et al.*, 2004) e de 7,1% (30/422) (Leite *et al.*, 2012) no Brasil e de 15,9% (56/351) na Itália (Cringoli *et al.*, 2001). Utilizando a técnica de PCR foi observada prevalência de 9,3% (49/525) na Índia (Rani *et al.*, 2010), tendo sido apenas observado 0,6% (3/525) por microscopia.

Os animais não apresentaram sintomatologia típica de *D. immitis*, para além da microfilarémia. É possível a prevalência obtida por este estudo encontrar-se subestimada, por ter sido determinada apenas pela técnica de Knott, que apresenta uma sensibilidade de 38,4% e uma especificidade de 100% (Wang, 1997). Para a pesquisa de microfilárias, o método de filtração é mais eficaz, contudo a técnica de Knott é melhor na sua diferenciação (Reifur *et al.*, 2004). Poderíamos aumentar a sensibilidade efetuando-se, por exemplo, a técnica de PCR. No entanto, deve ser sempre efetuado um teste de pesquisa de antígeno para detetar as infecções ocultas, tendo sempre em consideração se este antígeno é específico apenas para machos, para fêmeas ou para ambos os sexos.

A observação de eosinofilia, ao microscópio ótico, no esfregaço sanguíneo de um animal (ID-19), poderá dever-se à infecção por *D. immitis*, uma vez que aquela é uma das alterações hematológicas detetadas (Bowman *et al.*, 2009).

Pelo potencial risco zoonótico, seria importante a realização de estudos que correlacionassem os fatores ambientais, sanitários, sócio-económicos e a sensibilização da comunidade para o problema. Sugerem-se, ainda, novos estudos, utilizando também uma técnica mais sensível (PCR quantitativo), nomeadamente para pesquisa de microfilárias e ainda estudos sobre o vetor e a infecção deste, para que se possa estimar o real risco de transmissão deste nemátode. Dada a elevada prevalência de *A. reconditum*, a correta distinção com *D. immitis* é necessária, para se evitar falsos diagnósticos positivos. O teste da actividade fosfatase ácida será o mais vantajoso, uma vez que permite a distinção de microfilárias de *D. immitis*, *D. repens*, *A. reconditum* e *A. dracunculoides*. Assim verificar-se-á evidência dos poros excretor e anal no caso de *D. immitis*, apenas do poro anal no caso de *D. repens*, do poro anal, excretor e corpo interno no caso de *A. dracunculoides* e nenhuma actividade fosfatásica ácida em *A. reconditum* (Magnis *et al.*, 2013). No entanto, deve ser sempre realizado um teste de pesquisa de antigénio para observação de infeções ocultas, já que estas são frequentemente verificadas.

#### **4.7.3. Co-infeções**

Foram detetados, neste estudo, 5 animais que apresentaram co-infecção por *D. immitis* e *L. infantum*. Segundo De Tommasi *et al.* (2013), até ao momento só havia sido reportado um caso desta co-infecção, em Itália. Provavelmente esta co-infecção é raramente pesquisada. No que respeita à infecção mista de *D. immitis* e *A. reconditum* detetada num animal, é normal, tendo sido também reportado por Wang (1997).

#### **4.7.4. Influência de fatores na infecção de *D. immitis***

Relativamente à época do ano e a presença de *D. immitis*, não se verificou uma associação estatisticamente significativa, apesar da actividade dos culicídeos decorrer entre a primavera e o verão, nos países da Europa (Morchón *et al.*, 2012). O diagnóstico da infecção foi efetuado no momento da captura, desconhecendo-se quando terá sido o animal infetado. Curiosamente, não foi detetado a infecção em nenhum animal capturado nos meses de outubro a dezembro, tendo os animais capturados nos meses de julho a setembro apresentado a maior prevalência de *D. immitis* (22,73%).

No que respeita à influência da idade na infecção por *D. immitis*, não foi verificada uma associação estatisticamente significativa. Contudo, não foram observados animais positivos com idade inferior a 1 ano, quer por deteção de antigénio, quer por pesquisa de microfilárias, sendo este resultado normal, quer pelo reduzido tempo de exposição, quer pelo período necessário até formação do parasita adulto (2 a 3 meses) e de microfilárias (6 meses) (González-Miguel *et al.*, 2013). A prevalência maior (21,05%) foi verificada na faixa etária de 3 a 7 anos. Estudos de Yuasa *et al.* (2012) verificaram uma

associação estatística entre a idade e a infeção por *D. immitis*, com maior prevalência em animais com idade superior a 4 anos.

A influência do comprimento do pêlo e a presença de *D. immitis* não foi verificada estatisticamente. No entanto, os animais com pêlo curto revelaram uma prevalência de *D. immitis* de 14,89% (7/47), superior a 9,52% (2/21) em animais de pelo médio e 8,33% (1/12) em animais de pêlo comprido.

#### **4.7.5. Pesquisa de larvas de *A. vasorum* pela técnica de Baermann**

A técnica de Baermann foi a técnica seleccionada para a detecção de larvas de *A. vasorum*, por concentrar as larvas dos nemátodes que sedimentam no fundo do recipiente, pela acção da gravidade (Bowman *et al.*, 2009). A ausência de larvas *A. vasorum* pela técnica de Baermann não significa que não exista o parasita no concelho de Vila Franca de Xira, pois observaram-se fezes da amostra populacional colhidas apenas num dia, o que não é o adequado, pela excreção intermitente do parasita. Estudos de Madeira de Carvalho *et al.* (2009) verificaram uma prevalência de 0,3% (2/579) de cães infectados com *A. vasorum* e *Eucoleus aerophilus* na região de Lisboa. Também Nabais, Gomes, Ferreira da Silva, Vicente & Madeira de Carvalho (2012) verificaram uma prevalência de 2% (1/50) de *A. Vasorum*, na mesma região. Seriam necessários novos estudos, aumentando a amostra populacional, uma vez que a prevalência de *A. vasorum* poderá ser muito reduzida e, efetuar-se colheitas de fezes durante 3 dias consecutivos, para aumentar a sensibilidade (Ballweber, 2012).

#### **4.8. Pesquisa de parasitas intestinais**

Diversos estudos de pesquisa de parasitas em fezes provenientes de cães de vários grupos populacionais (com proprietário, de canis privados e públicos, errantes, de caça, etc.) têm sido realizados, utilizando vários métodos coprológicos e inclusive necrópsia com decantação do conteúdo do aparelho digestivo para pesquisa de parasitas. Alguns dos estudos mais recentes encontram-se na tabela 35 (anexo VII).

A pesquisa de parasitas intestinais pelos métodos de Willis e de Ziehl-Neelsen revelou um total de 9 géneros de parasitas e uma prevalência global de 72,50% (58/80) dos animais. Outros estudos efetuados na população de cães errantes revelaram prevalências de parasitas intestinais de 9,4% (42/445) (Becker, Rohen, Epe & Schnieder, 2012) a 99,1% (110/111) (Xhaxhiu *et al.*, 2011), sendo que num estudo efetuado no Brasil, por Katarigi & Oliveira-Sequeira (2008) foi obtida uma prevalência de infeção por parasitas intestinais de 73,6% (95/129) em cães errantes, muito semelhante à encontrada neste estudo. As prevalências individuais observadas neste estudo foram, por ordem decrescente: *Giardia* spp. (32,5%), *Uncinaria stenocephala* (16,25%), *Toxocara canis* (15,0%), *Ancylostoma caninum* (15,0%), *Trichuris vulpis* (11,25%), *Cryptosporidium* spp. (11,25%), *Taenia* spp. (10,0%), *Strongyloides stercoralis* (7,5%), *Dipylidium caninum* (3,75%). Verificou-se, assim uma elevada prevalência de parasitas intestinais, principalmente nemátodes (51,2%) e protozoários (40,0%). O facto dos animais errantes deambularem pelas ruas, com acesso a detritos alimentares,



fezes de outros animais, águas e solos contaminadas tornam-nos numa população com elevado risco de infeção. Foram verificadas, por outros autores, prevalências semelhantes de *T. canis*: 10,3%(4/39) no Norte de Portugal (Silva, 2008), 12,4% (22/178) na Dinamarca (Al-Sabi *et al.*, 2013), 13% (31/239) na Itália (Riggio, Mannella, Ariti & Perrucci, 2013), 16,35% (318/1944) na Argentina (Soriano *et al.*, 2010) e 18% (270/1500) em Espanha (Martínez-Moreno *et al.*, 2007), tendo sido utilizados métodos de flutuação. A prevalência no Oeste da Europa varia entre 3,5% a 34%, em animais provenientes de vários contextos epidemiológicos (animais de casa, de canil, errantes e de ambiente rural), assim como vários estudos, por todo o Mundo, têm demonstrado uma elevada prevalência (10 a 30%) de contaminação dos solos, especialmente em parques públicos (Overgaaauw & van Knapen, 2013). Um estudo em Itália (Habluetzel *et al.*, 2003) sobre *T. canis*, contaminação ambiental e risco para o Homem, detetou uma prevalência bastante superior de 33,6% (99/295) de animais infetados. Este estudo indentifica as zonas rurais como as mais afetadas (48,4%), provavelmente pela consciencialização dos proprietários dos animais, nas zonas urbanas, para a administração de anti-helmínticos. Sendo o concelho de Vila Franca de Xira composto por um misto de zonas rurais e urbanas, provavelmente existirão zonas distintas de contaminação ambiental, pelo que seriam necessários novos estudos que, incidissem em fezes recolhidas em locais públicos. Foram observados ovos de *T. canis* no pêlo de um animal, aquando da observação de material colhido em raspagem cutânea. Estudos de Overgaaauw *et al.* (2009), identificaram prevalências superiores de *T. canis* no pêlo do que nas fezes, pelo que provavelmente seria detetado no pêlo de mais animais da amostra infetados com o parasita. Contudo não se efetuou tal estudo. Segundo alguns autores (Martínez-Moreno *et al.*, 2007; Overgaaauw *et al.*, 2009), a presença de ovos embrionados de *T. canis* no pêlo, especialmente em cachorros e em cães errantes, é um indicador que o contato directo com estes animais poderá colocar o Homem em risco de infeção.

A prevalência de *S. stercoralis* observada neste estudo (7,5%) foi superior à de 0,8% (2/239), verificado em Itália por Riggio *et al.*, (2013), o que tem uma importância acrescida, pelo carácter zoonótico deste parasita. No entanto, foi verificada uma prevalência superior de 25,6%(10/39) no Norte de Portugal (Silva, 2008)

A prevalência de *A. caninum* (15%) obtida neste estudo encontra-se em concordância com o valor de 13,5 % (15/111) obtido na Albânia por Xhaxhiu *et al.* (2011). No entanto, estes autores efetuaram além dos métodos de flutuação, o de lavagem do aparelho digestivo e observação do conteúdo. Outros autores verificaram prevalências superiores de *A. caninum* de 23,4% (54/231) nos EUA (Savila *et al.*, 2011). Foram, ainda, obtidas prevalências de 95,7% (44/46) no Brasil (Klimpel, Heukelbach, Pothmann & Rückert, 2010), também em cães errantes, mas utilizando-se além dos métodos de flutuação, a necrópsia. De salientar que, *A. caninum* é um dos parasitas intestinais mais patogénico para os cães (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2008).

A prevalência observada de *U. stenocephala*, apesar de elevada foi inferior à obtida noutros estudos: 33,60% (504/1500) em Espanha (Martínez-Moreno *et al.*, 2007) e 64,9% (72/111) na Albânia (Xhaxhiu *et al.*, 2011). No entanto, estes últimos autores realizaram, além do método de flutuação, a necrópsia dos animais. As elevadas prevalências de ancilostomídeos são comuns em cães errantes

(Asharaf *et al.*, 2008; Klimpel *et al.*, 2010), podendo, por isso, encontrar-se mais amplamente distribuídos do que se pensa.

A prevalência de *T. vulpis* (11,25%) encontrada neste estudo foi superior à de 1,6% (2/124) verificada por Lebre (2011), em cães do canil de Lisboa. Foi, ainda, superior à de 7,7% (3/39) no Norte de Portugal, por Silva (2009) e à de 7,8% (18/231) obtida nos EUA, por Savilla, Joy, May & Somerville (2011). No entanto foram verificadas prevalências superiores de 21,6% (24/111) na Albânia, por Xhaxhiu *et al.* (2011), tendo os autores efetuado a observação do conteúdo do aparelho digestivo obtido por lavagem, além do método de flutuação. A prevalência de *T. vulpis* pode estar subestimada, pois que a libertação de ovos é intermitente (Traversa, 2011). Não tem, no entanto, a importância zoonótica atribuída a outros nemátodes.

No que respeita aos céstodes, não é possível distinguir, morfologicamente, as espécies do género *Taenia*, pelos métodos de flutuação (Beiromvand *et al.*, 2013). A prevalência de *Taenia* spp. (10%) obtida foi semelhante à de 12,65% (246/1944) observada também, em cães errantes, na Argentina (Soriano *et al.*, 2010). No entanto prevalências superiores foram obtidas em populações de cães errantes: 18% (14/77) no Irão (Beiromvand *et al.*, 2013) e 18,9% (21/111) na Albânia (Xhaxhiu *et al.*, 2011). No Norte de Portugal foram obtidas prevalências inferiores, de 2,6% (1/39) por Silva (2008).

Relativamente a *D. caninum* a prevalência de 3,75% foi detetada por observação de proglotes nas fezes, não tendo sido observados ovos pela técnica de Willis. Pelo confinamento nos proglotes, dos ovos de *D. caninum* a deteção destes por técnica de flutuação é difícil (Nelson & Couto, 2001), pelo que a não observação pela técnica de Willis é normal. Outros estudos revelaram prevalências muito elevadas: 45,7% (21/46) no Brasil (Klimpel *et al.*, 2010) e 65,8% (73/111) na Albânia (Xhaxhiu *et al.*, 2011), tendo sido realizadas outras técnicas (necrópsia no primeiro caso, lavagem do aparelho digestivo no segundo e, sedimentação, em ambos), o que não foi efetuado neste estudo. Para aumentarmos a sensibilidade na pesquisa de céstodes deverá ser acrescida a técnica de sedimentação.

Não foram detetados ovos de *T. leonina*, os quais são muitas vezes observados, em prevalências que variam de 0,4% a 29% (Dubná *et al.*, 2007; Gracenea, Gómez & Torres, 2009; Becker *et al.*, 2012; Riggio *et al.*, 2013; Beiromvand *et al.*, 2013). Não foram, também, identificados, pelo método de flutuação, oocistos de coccídeos (como *Cystoisospora* spp.), observados em vários estudos, com prevalências entre 0,6% e 26,3% (Dubná *et al.*, 2007; Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2008; Claerebout *et al.*, 2009; Gracenea *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Barutzki & Schaper, 2011; Becker *et al.*, 2012; Riggio *et al.*, 2013; Beiromvand *et al.*, 2013). As taxas de infeções por endoparasitas podem encontrar-se subestimadas, uma vez que, segundo Klimpel *et al.* (2010), os exames fecais não são o método mais eficaz para verificar prevalências, mesmo numa população de alto risco, como a de animais errantes. Os mesmos autores referem que, no caso dos ancilostomídeos, a sensibilidade dos exames fecais é alta, mas não o é, no caso de *Toxocara canis* e de *Trichuris vulpis*. No caso dos céstodes, as prevalências reais serão certamente superiores, pelos motivos já referidos.

*Giardia* spp. foi a espécie parasitária intestinal com maior prevalência neste estudo (32,5%). É o protozoário mais frequentemente encontrado em cães, com prevalências de 0,1% (Dubná *et al.*, 2007) a 34,6% (Mircean, Györke & Cozma, 2012), pelo que a prevalência obtida foi,

comparativamente com outros estudos, das mais elevadas. Devido à infeção ser frequentemente crónica e assintomática, é muitas vezes subdiagnosticada. Contudo deve ser tida em especial atenção, não só pela diversidade de meios de veiculação, como pelo carácter zoonótico e pelo facto do cão ser frequentemente um reservatório assintomático. Em Portugal, estudos de Ferreira *et al.* (2011) (tabela 35, anexo VII), verificaram uma prevalência global de *Giardia* spp. de 23% (34/148), sendo 47% em animais de canil. Um estudo recente realizado em Portugal por Maia, Nogueira, Mendão e Cardoso (2013b) revelou uma prevalência de 17,5% (24/137) em cães até 12 meses de idade. No entanto, foi utilizado um *kit* comercial de deteção de antigénio e numa população de CAMV's até 12 meses de idade e, com sinais gastrointestinais. A prevalência superior obtida no presente estudo poderá dever-se ao fato dos animais serem errantes e, portanto, com maior risco de infeção e, pela amostra incluir várias faixas etárias. Apesar de muitas infeções ocorrerem no primeiro ano de vida do animal, os animais mais velhos já foram, em princípio, mais expostos. Por outro lado, a deteção do protozoário por testes de deteção de antigénio é mais sensível de que a pesquisa de quistos ao microscópio ótico, uma vez que estes são eliminados intermitentemente.

No que respeita a *Cryptosporidium* spp., têm sido observadas prevalências entre 0,0% (0/239) (Riggio *et al.*, 2013) e 17,6% (6/34) (Lebre, 2011), ambos utilizando testes comerciais. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. (11,25%), é muito elevada, quando comparado com outros estudos efetuados em cães errantes: 5%(4/77), por Beiromvand *et al.* (2013) e 6,3% (32/505), por Gracenea *et al.* (2009), utilizando ambas técnicas em esfregaços de fezes. A prevalência obtida é, no entanto, inferior à de 17,6%, verificada por Lebre (2011), em cães de canil da cidade de Lisboa, tendo sido, contudo, utilizada uma técnica diferente (imunofluorescência direta). Animais em “stress” podem induzir a eliminação de oocistos (Palmer *et al.*, 2008), pelo que esta poderá ser uma das possíveis causas da elevada prevalência obtida.

Apesar dos quistos de *Giardia* spp. serem menos resistentes que os de *Cryptosporidium* spp., a sua maior prevalência, quer neste, quer noutros estudos, pode dever-se a um mais prolongado período de excreção dos quistos de *Giardia* spp. em relação aos oocistos do *Cryptosporidium* spp. (Olson, O'Handley, Ralston, McAllister & Thompson, 2004).

Neste estudo foi verificado que todos os animais que apresentavam fezes diarreicas (n=8) apresentaram, pelo menos, um parasita intestinal e, que 86,2% (50/58) dos animais infetados por parasitas intestinais apresentaram fezes normais. Estes resultados estão em concordância com um estudo efetuado na Florida, em animais de um canil oficial, em que 96% (48/50) dos animais que entraram com fezes diarreicas tinham um agente patogénico intestinal, em comparação com 78% (39/50) de animais que estavam parasitados e que apresentavam fezes normais (Tupler *et al.*, 2012). No entanto, nesse estudo verificaram-se outros agentes patogénicos para além de parasitas. A presença de um parasita intestinal poderá ser a principal causa de diarreia em cães errantes. Contudo, a simples identificação de ovos/quistos/oocistos correspondentes a um ou mais parasitas intestinais, não significa que estes sejam a causa da diarreia, sendo necessário, exames complementares de diagnóstico. Ademais, não foram efetuados exames coprológicos de determinação da carga parasitária. Dependendo do agente parasitário, uma elevada carga parasitária causará, em princípio, mais sintomatologia clínica do que uma baixa, sendo que nem sempre se

verifica tal correspondência. No presente estudo, verificou-se que, dos animais que apresentavam parasitas intestinais, muitos (86,2%) apresentavam as fezes normais. Tal poderá ser devido à presença de infecções crônicas e subclínicas ou infecções com baixa carga parasitária. Ainda, os sinais clínicos diferem consoante o agente parasitário, podendo ou não incluir a diarreia. A população de cães errantes, pelas condições que a caracterizam, poderão, ainda, ter adquirido alguma resistência ao desenvolvimento de transtornos intestinais e por cronicidade parasitária, poderão ter desenvolvido alguma habituação à convivência com o parasita. A este respeito, poderão ser desenvolvidos novos estudos, nomeadamente com relação entre sinais clínicos e infecção parasitária intestinal, na população canina errante.

Foi verificada eosinofilia em esfregaços sanguíneos de 3 animais, apresentando estes, ovos de nemátodes e quistos/ocistos de protozoários, sendo que 2 apresentaram infecções mistas por estes parasitas intestinais. A presença de parasitas intestinais poderá provocar um aumento do número de eosinófilos circulantes (Nelson & Couto, 2001; Bowman *et al.* 2009).

Foi ainda, identificado *T. canis* numa cadela em gestação. A imunossupressão ocorrida no período de gestação favorece a migração traqueal e o desenvolvimento intestinal de larvas de *T. canis* recém adquiridas ou larvas somáticas (Schnieder *et al.*, 2011). De referir que os cachorros poderão vir a ser infectados pela via transplacentária (muito frequente) ou pela via galactogénica (Schnieder *et al.*, 2011; Overgaauw & van Knapen, 2013).

No total de espécies de parasitas intestinais identificadas neste estudo, *T. canis*, *A. caninum*, *U. stenocephala*, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., são as de maior importância zoonótica, tendo sido também as mais prevalentes.

#### **4.8.1. Co-infecções parasitárias intestinais**

Foram detetadas infecções mistas em 40,0% dos animais, verificando-se infecção por duas (33,75%) e por três (6,25%) espécies diferentes. Detetou-se assim, uma prevalência elevada de infecções parasitárias intestinais mistas. O fato dos animais errantes não serem submetidos a tratamentos permite que infecções se mantenham por tempo prolongado e facilita as infecções mistas. Um estudo realizado na Albânia por Xhaxhiu *et al.* (2011) detetou infecções mistas de endoparasitas num número superior de 88,3% (98/111) de animais, com infecção por duas (29,7%), três (18,0%), quatro (20,7%), cinco (13,5%) e seis (6,3%) espécies diferentes. Tendo em conta os diferentes grupos parasitários estudados, foi verificado que ocorreu infecções mistas de nemátodes em 12,5% (10/80) dos animais, um número um pouco inferior a 18,9% (75/396) na Nigéria, por Ugbomoiko, Ariza & Heukelbach (2008). No entanto estes autores utilizaram outra técnica coprológica.

Foram verificadas infecções mistas de protozoários intestinais em 3,75% dos animais e, não foi detetada nenhuma infecção mista de céstodes. Contudo, no caso dos céstodes, o valor obtido não tem significado, uma vez que o método de flutuação não permite a distinção de *Taenia* sp. e não é adequado para a deteção de *D. caninum*. Em Portugal, foram identificadas infecções mistas de 7,4% (11/148) por dois ou 1,4% (2/148) por três parasitas intestinais, em cães de canil e de CAMV's (Ferreira *et al.*, 2011).

As co-infecções parasitárias mais frequentes foram as de *Giardia* spp./*T. canis* (6,25%), *Giardia* spp./*A. caninum* (5,0%), *Giardia* spp./*U. stenocephala* (3,75%) e *T. canis*/*U. stenocephala* (3,75%), o que poderá dever-se às respetivas taxas de infeção individuais, uma vez que foram os parasitas com maiores prevalências.

Como verificado neste estudo e em outros, são frequentes as infeções parasitárias intestinais mistas, especialmente por nemátodes, nas populações não submetidas a tratamentos profiláticos.

#### **4.8.2. Influência de fatores**

Relativamente à influência do fator idade na infeção por parasitas intestinais, foi verificada uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ) para o grupo dos nemátodes, tendo-se observado maiores prevalências em animais até 1 ano de idade (63,6%) e animais de 1 a 3 anos de idade (69,2%). Outros estudos (Savilla *et al.*, 2011; Overgaauw & van Knapen, 2013; Riggio *et al.*, 2013), também observaram prevalências superiores de nemátodes em cachorros, especialmente por transmissão por via transplacentária e lactogénica. Acresce que os animais errantes com idade inferior a 1 ano têm elevada probabilidade de terem nascido de cadelas errantes e nunca terem tido um proprietário. As cadelas errantes encontram-se em maior risco de infeção por nemátodes e não são sujeitas a desparasitações pré, pós e no parto e consecutivamente, existe um elevado risco dos cachorros serem infetados. O facto de se ter observado prevalências muito elevadas de animais entre 1 e 3 anos de idade pode ser devido a estes animais não terem sido sujeitos a nenhum tratamento profilático desde o nascimento. Ainda, poderá dever-se ao facto da maioria dos nemátodes apresentar ciclos biológicos monoxenos e os animais jovens terem tendência a ingerir tudo o que se deparem, nomeadamente fezes de outros cães. Não foi verificada uma associação estatisticamente significativa entre a idade e a infeção por céstodes, assim como, entre o fator idade e infeção por protozoários intestinais.

No que respeita à influência da época do ano e a presença de infeções parasitárias intestinais, não foram observadas associações estatisticamente significativas, para nenhum dos grupos parasitários (nemátodes, céstodes e protozoários). No entanto, foram constatadas prevalências maiores de infeção por protozoários nos meses de outubro/dezembro (57,14%) e abril/junho (55,56%). Estes dois picos de excreção de quistos/oocistos e, consecutivamente, de infeção destes protozoários, poderão dever-se a um aumento de ansiedade dos animais errantes nos períodos referidos. De facto, o período de abril/junho é aquele onde, normalmente, ocorrem maior número de abandonos, uma vez que se aproximam as férias do Verão. O período de outubro/dezembro, poderá também levar a um aumento de ansiedade, devido às alterações climáticas (desfavoráveis). Segundo os registos meteorológicos, os meses de outubro e novembro de 2011 foram aqueles que se verificaram maiores precipitações, tendo sido o mês de novembro, aquele em que se verificou maior descida de temperatura.

Relativamente à influência do sexo em infeções parasitárias intestinais, também não foram verificadas associações estatisticamente significativas, para nenhum dos grupos parasitários.

Contudo, foi observada uma prevalência superior de nemátodes em cadelas, o que poderá ser devido à ativação de larvas, por imunossupressão, durante a gestação ou lactação (Schnieder *et al.*, 2011). Não se sabe, no entanto, se as cadelas capturadas já estiveram prenhes e se este acontecimento decorreu durante a “fase da vida errante”. Mas, existe grande probabilidade de ocorrência de gestação de cadelas errantes, uma vez que, a sua maioria não se encontra esterilizada e, não são sujeitas a tratamentos contraceptivos, nem restrição de acesso ao macho durante o cio.

#### **4.9. Detecção de ectoparasitas**

As prevalências observadas de ácaros das espécies *D. canis*, *S. scabiei* e *C. yasguri*, encontram-se, provavelmente, subestimadas, uma vez que só foram considerados os casos sintomáticos e não na amostra toda (n=80). Já a pesquisa de *O. cynotis* e de ectoparasitas macroscópicos, foi efetuada em toda a amostra populacional.

##### **4.9.1. Raspagem cutânea**

Neste estudo observou-se uma prevalência de 35,0% de ácaros (em animais suspeitos), por raspagem cutânea. Estudos de Rodriguez-Vivas *et al.* (2003), reportaram uma prevalência semelhante (34,0%) de ácaros, em animais errantes, tendo, no entanto, sido examinados todos os animais e não apenas os suspeitos. Foram, no entanto, observados também em animais errantes, por outros autores, prevalências de infestação por ácaros superiores: 45,6%, República da Coreia (Chee *et al.*, 2008). Neste estudo, observaram-se prevalências de 30,0% de *S. scabiei* e 10,0% de *D. canis*, em animais suspeitos, sendo que, em princípio, a prevalência seria menor se se tivesse incluído toda a amostra populacional, pois alguns animais podem ser assintomáticos. Estudos de Fondati *et al.* (2009), referentes a *D. canis*, verificaram que a probabilidade de encontrar este ácaro em cães saudáveis é baixa, não devendo ultrapassar os 5,4%. Também Rodriguez-Vivas *et al.* (2003) observaram que 66% dos animais com infestação por ácaros apresentavam lesões na pele e que apenas 3% dos animais com pele saudável apresentam a presença de ácaros. Foram reportadas, também em cães errantes, prevalências inferiores de infestação pelas espécies: *D. canis*, 4,9% (Chee *et al.*, 2008) e 7,2 % (Tsai *et al.*, 2011) e *S. scabiei*, 5,56% (Xhaxhiu *et al.*, 2009), 7,0% (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003) e 19,4% (Chee *et al.*, 2008). Apesar de *S. scabiei* ser a espécie mais frequentemente encontrada na pele, alguns autores reportam *D. canis* como a mais prevalente: 23,0%, no México (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003). As prevalências observadas neste estudo poderão encontrar-se sobrestimadas, uma vez que não incide na amostra da população errante (n=80), mas sim num número reduzido de indivíduos da amostra (n=20), que terão maior probabilidade de apresentar infestação, já que apresentam lesões sugestivas. As diferentes prevalências observadas pelos vários autores em diferentes países devem ser avaliadas cuidadosamente, uma vez que dependem de fatores epidemiológicos, como a sazonalidade, periodicidade, comportamento animal e resistência inata (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2003).

A observação de ovos de *Toxocara canis* na raspagem cutânea de uma animal é comum, por estes se fixarem facilmente ao pêlo (Overgaauw *et al.*, 2009).

#### **4.9.2. Colheita de cerúmen**

Não foi observado, neste estudo, a presença de *O. cynotis*. Estudos de Chee *et al.* (2008), reportam este ácaro como o mais prevalente (22,3%) em animais errantes. Outros estudos referem prevalências de *O. cynotis* mais baixas: 0,6% (Xhaxhiu *et al.*, 2009), 3,5 % (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2003) e 4,6% (Mosallanejad *et al.*, 2012).

A prevalência deste ácaro pode encontrar-se subestimada neste estudo, pelo que seriam necessários novos estudos, com uma população-amostra maior, para a sua confirmação. Estima-se que o ácaro *O. cynotis* seja responsável por apenas 5 a 10% das otites em cães (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2003), contudo, não foram observados sinais de otite em nenhum dos animais da amostra.

#### **4.9.3. Escovagem do pêlo**

Não foram observados ácaros de *C. yasguri* neste estudo, no entanto, só foram pesquisados os animais sintomáticos. Muitas vezes os ácaros de *C. yasguri* não são observados ao microscópio ótico, mas consegue-se observar os ovos presos aos pêlos (Ghubash, 2006). Contudo, não foram observados ovos no pêlo dos animais sintomáticos. Por se ter efetuado pesquisa num grupo muito reduzido de animais da amostra, novos estudos deverão ser realizados, utilizando-se uma amostra maior, para verificar a real prevalência de *C. yasguri* na população canina errante.

#### **4.9.4. Colheita de ectoparasitas macroscópicos**

Foi observada uma prevalência de 23,75% (19/80) de infestação por ixodídeos, na amostra populacional, dos quais todos pertenciam à espécie *R. sanguineus*. Heukelbach *et al.* (2012) reportaram, no Brasil, uma prevalência superior (89,7%). Outros estudos observaram prevalências muito inferiores: 7,14%, no Irão (Mosallanejad *et al.*, 2012) e 10,8%, na Malásia (Wells *et al.*, 2012). Verificou-se, neste estudo, uma prevalência de 100% de *R. sanguineus* no total de ixodídeos colhidos. Prevalências muito elevadas deste ixodídeo também foram observadas por outros autores: 90,36%, no concelho de Óbidos, Portugal (Crespo, Rosa & Almeida, 2013), 94,6% no México (Galaviz-Silva, PérezTreviño & Molina-Garza, 2013), 98,3% no Paquistão (ul-Hasan, Abubakar, Muhammad, Khan & Hussain, 2012) e 100%, no Brasil (Klimpel *et al.*, 2010). Em Portugal, foram observadas prevalências inferiores: 36,8%, em Bragança (Santos-Silva *et al.*, 2006) e 33,9% (Santos-Silva *et al.*, 2011). *R. sanguineus* e *D. reticulatus* são os principais ixodídeos encontrados em cães em Portugal. No entanto, *R. sanguineus* tem ampla distribuição por todo o país, enquanto a distribuição de *D. reticulatus* é mais desigual, sendo observado com maior frequência no Norte de Portugal, apesar de existir, também, no Distrito de Lisboa (Santos-Silva *et al.*, 2011). Segundo Santos-Silva *et al.* (2006) a distribuição de *I. ricinus* em Portugal é, também, desigual entre as várias

regiões/locais, dependendo muito da considerável cobertura vegetal e de elevados níveis de humidade relativa (acima de 90%). Ora, no concelho de Vila Franca de Xira, não existe uma vegetação abundante, nem uma humidade relativa tão acentuada, o que poderá explicar a não observância deste ectoparasita no estudo.

Este estudo verificou uma prevalência de 10,0% de animais com pulgas, sendo todos os exemplares da espécie *C. felis*. Já foram observadas em cães errantes, prevalências superiores (74,2%, Brasil) por Heukelbach *et al.* (2012) e inferiores (5,0%, Albânia) por Xhaxhiu *et al.* (2009) e (7,6%, Malásia) por Wells *et al.* (2012). Estudos de Arijó, Omani & Rajput (2007), no Paquistão, observaram também todos os exemplares de pulga, da espécie *C. felis*. No entanto, são observadas com frequência outras espécies, nomeadamente *C. canis* com prevalências de 39,1% (Klimpel *et al.*, 2010) e 75,7% (Xhaxhiu *et al.*, 2009) e *P. irritans* com prevalências de 8,3% (Xhaxhiu *et al.*, 2009).

As diferentes prevalências, quer de *R. sanguineus*, quer de *C. felis*, verificadas pelos diferentes autores devem ser comparadas cuidadosamente, devendo ter sempre em consideração a região, a população canina a que se refere, a época do ano e, de que forma foram colhidos os ectoparasitas (na totalidade ou apenas parcialmente). Neste estudo, a colheita foi efetuada durante 1 ano, tendo sido colhidos alguns exemplares existentes no animal. Na sua maioria, os animais errantes infestados por ectoparasitas, apresentaram uma elevada carga parasitária. O autor observou animais com cerca de 30 a 40 ixodídeos em redor de cada orelha e, ainda, muitos noutras regiões do corpo. Dada a extensão do estudo não foram colhidos todos os ectoparasitas macroscópicos, quer de ixodídeos, quer de pulgas. No caso das pulgas é extremamente difícil a recolha de todas manualmente, pelo tamanho reduzido e pela constante mobilidade destas. Ainda, a sua visualização é difícil, por existirem muitas vezes em número reduzido (Bowman *et al.*, 2009).

Provavelmente a prevalência de *R. sanguineus*, na população de ixodídeos, poderá não ser exatamente 100,0%, até porque noutros estudos realizados em Portugal, foram observadas outras espécies de ixodídeos: *R. pusillus* (Crespo *et al.*, 2013), *Dermacentor marginatus* e *D. reticulatus* (Santos-Silva *et al.*, 2006), com prevalências de 9,64%, 15,8% e 47,4%, respetivamente. Foram ainda identificadas outras espécies: *Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventralloii* e *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Santos-Silva *et al.*, 2011). Além disso, não foram colhidos ixodídeos nas formas larvares, mas apenas ninfas e adultos e não foram contabilizados o número de machos e fêmeas.

A inclusão, neste estudo, de vetores ixodídeos foi importante para se conhecer quais os agentes vetores mais prevalentes e, consecutivamente, prever as DCTI mais frequentes. No entanto, para melhor compreensão, seriam necessários estudos que verificassem a infeção dos respetivos vetores, o que não foi realizado. A espécie *R. sanguineus* é um importante vetor, nomeadamente por poder transmitir *E. canis*, *R. conorii*, *B. vogeli* e *H. canis*. Poderá também, ocasionalmente, transmitir *L. infantum* (Dantas-Torres *et al.*, 2010a; Trotta *et al.*, 2012). A espécie *C. felis* é, também, um importante vetor, por ser hospedeiro intermediário de *D. caninum* e de *A. reconditum*.

Os resultados referentes a ectoparasitas macroscópicos podem encontrar-se subestimados, uma vez que não só não foram colhidos e identificados todos os ixodídeos e pulgas que infestavam os animais, como não foram colhidos ectoparasitas nos vários estádios. Assim, não foram identificadas,



adequadamente, possíveis infestações mistas de ixodídeos ou pulgas. Foram identificadas infestações mistas de *R. sanguineus* e *C. felis* em apenas dois animais.

Todos os animais em que foram observados ixodídeos ou pulgas, foram posteriormente sujeitos a desparasitação externa com banhos de amitraz (Taktic®) ou imidaclopride+permetrina spot-on (Advantix®).

Pela prevalência elevada de *R. sanguineus* e, sendo este um vetor importante na transmissão de vários agentes infecciosos ao Homem (Silva *et al.*, 2006), deverá ser controlado, quer nos animais, quer no ambiente.

#### **4.9.4.1. Influência de fatores**

Houve uma associação estatisticamente significativa entre a época do ano e a presença de *R. sanguineus*, tendo sido mais fidedigno quando se efetuou a divisão bimestral, tendo-se constatado prevalências muito superiores nos meses de março/abril (55,0%), maio/junho (33,3%) e julho/setembro (45,4%) e prevalências nulas nos meses de novembro a fevereiro. De facto, a espécie *R. sanguineus* desenvolve-se bem a temperaturas entre 20 a 35 °C (Dantas-Torres, 2010b). Como foi observado no gráfico 3, as temperaturas máximas mantiveram-se abaixo dos 20°C nos meses de dezembro a fevereiro, sendo que o mês de novembro registou um valor ligeiramente acima (22,7°C). No entanto esse mês foi o mês com precipitação máxima diária mais elevada de todo o estudo, o que, provavelmente, não foi favorável ao desenvolvimento de *R. sanguineus*, mesmo numa temperatura adequada.

No caso de *C. felis* não foi verificada uma associação estatisticamente significativa. No entanto, foram colhidos poucos vetores desta espécie, pelo que, para se obter resultados mais conclusivos no que respeita à possível influência da época do ano, na infestação por *C. felis* em animais errantes, poderá ser realizado outro estudo, se possível numa amostra maior e, incidindo apenas em ectoparasitas.

## 5. Conclusão

Os objetivos propostos inicialmente foram atingidos, tendo este trabalho permitido obter um panorama parasitológico geral dos cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira. Foram identificados bastantes agentes parasitários nos cães errantes de Vila Franca de Xira, contribuindo-se assim para o estudo sobre os agentes parasitários em Portugal. Este estudo, quer pelo período contemplado, quer pela facilidade de acesso aos animais em causa, veio aprofundar o conhecimento parasitológico sobre a população de cães errantes do concelho de Vila Franca de Xira. Em alguns casos conseguiu-se estimar os principais riscos parasitários em animais capturados, de acordo com a idade, época do ano e sintomatologia apresentada.

A prevalência de parasitas nos animais errantes do concelho de Vila Franca de Xira foi muito elevada, o que tendo em conta as várias espécies parasitárias zoonóticas encontradas, constitui esta população, um verdadeiro problema quer para a saúde de outros animais, quer para a Saúde Pública. A elevada deteção de anticorpos contra agentes parasitários observados neste estudo, nomeadamente 28,75% de *Leishmania infantum*, 57,5% de *Babesia canis*/ *B. vogelli*/*B. rossi*, 34% de *Anaplasma phagocytophilum* e 76,2% de *Rickettsia conorii*, poderá significar que o concelho de Vila Franca de Xira é endémico a estes agentes, ainda que, em muitos casos, a infeção possa não estar presente, no momento. A manifestação de sintomas ocorrerá numa infeção ativa, mas a não observação de sintomas não implica que, a infeção não se encontre em fase ativa. A leishmaniose foi a doença infecciosa parasitária com maior número de animais sintomáticos. Todas as restantes infeções parasitárias passaram, na sua maioria, despercebidas ao exame de estado geral. Com as devidas cautelas no caso das infestações por ácaros, uma vez que não foram testados animais assintomáticos. Sendo os animais positivos a *L. infantum* e sintomáticos, significa que a infeção encontra-se ativa. Este facto é epidemiologicamente importante, pois o animal é assim um ótimo reservatório do agente, nomeadamente para a infeção do vetor flebotómico. O aumento da seroprevalência de *L. infantum* em cães errantes, nomeadamente por comparação com estudos anteriores, efetuados em Portugal, mostra que é necessária a adoção de novas medidas para o controlo da doença, com abrangência na população canina errante.

Relativamente às DCTI, deve-se estar atento a sinais compatíveis com as mesmas, especialmente as que são transmitidas pelo vetor *R. sanguineus*. A população canina errante deverá continuar a ser monitorizada nomeadamente em todas as CVBD endémicas no Concelho de Vila Franca de Xira.

A prevalência de *Dirofilaria immitis* detetada foi elevada (12,2%). Salientam-se os factos desta parasitose provocar sintomatologia clínica em fases mais tardias da doença, sendo muitas vezes subdiagnosticada e de terem sido detetados vários animais com co-infeção de *D. immitis* e *L. infantum*, uma vez que esta co-infeção havia sido raramente reportada.

Serão necessários novos estudos que confirmem a prevalência de parasitas pulmonares, nomeadamente *A. vasorum*, uma vez que este parasita não foi detetado neste estudo, mas já foi anteriormente detetado em na região de Lisboa (Madeira de Carvalho *et al.*, 2009; Nabais *et al.*, 2012).

As infeções parasitárias intestinais são muito frequentes em cães errantes do concelho de Vila Franca de Xira, tendo sido detetadas infeções em 72,5% dos animais. Realçam-se as elevadas

prevalência de *Giardia* spp. (32,5%), *Uncinaria stenocephala* (11,25%), *Toxocara canis* (15%) e *Ancylostoma caninum* (15%), todos agentes zoonóticos, mas também *Trichuris vulpis* (11,25%), *Cryptosporidium* spp. (11,25%), *Taenia* spp. (10%), *Strongyloides stercoralis* (7,5%) e *Dipylidium caninum* (3,75%). Ocorrem frequentemente, nos animais errantes, infecções parasitárias intestinais mistas (41,25%), podendo acometer parasitas do mesmo grupo ou de grupos parasitários diferentes. A infecção por nemátodes é mais frequente em animais jovens.

Não foi possível concluir acerca das infestações por ácaros, uma vez que muitos destes só foram pesquisados em animais que apresentassem lesões suspeitas. No entanto, foi possível verificar que animais que apresentem lesões cutâneas, têm 35% de probabilidade de se apresentarem infestados por ácaros.

A infecção por ixodídeos em animais errantes é comum (23,75%), principalmente por *Rhipicephalus sanguineus*, única espécie ixodídea detetada neste estudo. Este parasita é muito dependente da época do ano, verificando-se maiores prevalências nos meses de março a setembro e prevalências nulas nos meses de novembro a fevereiro. A infecção por pulgas também é muito comum, tendo sido, no entanto, detetada em apenas 10% dos animais e sendo todas da espécie *Ctenocephalides felis*.

## 6. Perspectivas e recomendações futuras

Este trabalho permitiu a implementação de melhorias no rastreio de infeções parasitárias aos animais que entram no Canil Municipal de Vila Franca de Xira, bem como uma melhor adequação de medidas profiláticas. É muito importante a adequação de estratégias de controlo da população canina errante, uma vez que, ao servirem de reservatório, mantêm a endemicidade da região em muitos agentes parasitários.

Tudo indica que as CVBD continuam a constituir um problema com significativa importância para a Saúde Pública e para saúde dos animais, nomeadamente no concelho de Vila Franca de Xira. Sugere-se a realização de estudos mais aprofundados e com a execução simultânea da técnica de PCR, no caso de *A. phagocytophilum*, para o conhecimento adequado da importância desta CVBD de carácter zoonótico, uma vez que os vetores de transmissão não foram detetados. Seria, ainda, interessante, a realização de exames hematológicos e bioquímicos, uma vez que poderão auxiliar no diagnóstico de infeção ativa.

A possibilidade de constituição de bancos de sangue a partir de cães errantes deve ser devidamente ponderada uma vez que se verificaram seroprevalências elevadas de *L. infantum* e de hemoparasitas de transmissão sanguínea, nomeadamente *B. canis*, *E. canis* e, possivelmente, *A. phagocytophilum*.

A prevalência de *D. immitis* observada neste estudo é bastante elevada, sugerindo que o concelho de Vila Franca de Xira possa ser endémico. Até agora pouca informação existia sobre este agente na população canina errante em Portugal, pelo que a elevada prevalência verificada, poderá significar que esta população constitui um reservatório importante do parasita, que também é zoonótico.

A dirofilariose deverá ser rastreada regularmente, no concelho de Vila Franca de Xira, especialmente nos animais que não efetuam a profilaxia adequada. O facto da sintomatologia associada surgir normalmente, numa fase tardia da doença, a infeção por *D. immitis* passa muitas vezes despercebida ao médico-veterinário clínico. Estudos para verificar prevalências de co-infeção por *L. infantum* e *D. immitis* deverão ser executados, uma vez que, até ao momento, poucos relatos existiam, tendo sido observados cinco casos neste estudo.

Sugerem-se novos estudos de pesquisa de *A. vasorum*, utilizando-se uma amostra maior e efectuando-se colheitas de fezes durante 3 dias consecutivos.

Apesar do risco evidente para o Homem e para os animais residentes no concelho de Vila Franca de Xira, de infeção por parasitas intestinais, serão necessários novos estudos com uma amostra maior, quer de animais errantes, quer de animais com proprietário e estudos de amostras colhidas nos vários locais frequentados, simultaneamente, por cães e pelo Homem, para melhor se compreender esta relação. Por muitos destes parasitas intestinais serem zoonóticos, deverão ser, regularmente, levados a cabo, estudos sobre as suas prevalências no ambiente, especialmente em jardins, parques infantis e outros locais onde cães e pessoas frequentem com regularidade.

Sugere-se ainda, o recurso a mais técnicas coprológicas (Sedimentação, McMaster, Faust modificado e testes comerciais de flutuação e de pesquisa de protozoários) e a necrópsia parasitária (no caso de cães errantes abatidos).

No que se refere às prevalências dos ectoparasitas macroscópicos, deverão ser realizados novos estudos, se possível numa amostra maior e colhendo-se o máximo de exemplares de cada animal, de forma a determinar, não só a prevalência de animais infestados pelos diferentes ectoparasitas, como as prevalências relativas de cada espécie.

No que se refer à gestão técnica do canil municipal de Vila Franca de Xira, todos os animais errantes do concelho de Vila Franca de Xira deverão, à entrada no canil, ser desparasitados externamente contra *R. sanguineus* e *C. felis*. Deverá ser implementado um programa profilático contra ectoparasitas a todos os animais já alojados e, ainda, contra flebotómíneos. Deverão ser efetuados rastreios de *L. infantum* em animais com mais de 1 ano de idade e obrigatoriamente a animais com 5 ou mais anos de idade, devendo ser devidamente avaliados os resultados serológicos positivos. Deverá ser realizado um esfregaço de sangue e testes de deteção de anticorpos apenas a animais suspeitos de DCTI, uma vez que a maioria dos animais evidenciam infeções antigas. Todos os animais e, em especial os de idade inferior a 3 anos deverão ser tratados com um anti-helmíntico, no mínimo. Contudo o ideal será a administração de medicamento que seja também eficaz contra céstodes, uma vez que apesar de menos prevalentes, foram observados em vários animais. Deverão ser efetuados testes coprológicos a todos os animais, nomeadamente técnicas de flutuação e esfregaços de fezes, devendo ser devidamente tratados todos os que apresentem evidência de parasitoses intestinais. Todos os animais deverão ser cuidadosamente observados, nomeadamente na pesquisa de lesões cutâneas, as quais deverão ser submetidas a raspagem profunda e observação microscópica, para pesquisa de ácaros. Todos os animais positivos deverão ser tratados em *box* individual e somente após a observação de duas raspagens negativas consecutivas, é que poderão ser alojados em *boxes* coletivas.

Os cães recém-chegados deverão, por isso, ficar alojados individualmente, até efetuarem todos os rastreios e tratamentos necessários. Pela observação de muitos agentes zoonóticos, os tratadores e apanhadores de cães, assim como os médicos veterinários municipais, deverão ser periodicamente sujeitos a exames médicos de rotina, sugerindo-se a observação clínica e a execução de análises hematológicas, bioquímicas, coprológicas e doseamento de IgE.

Este estudo poderá constituir, assim, uma importante ferramenta, para as Autoridades Sanitárias, quer de Saúde animal quer de Saúde Humana, podendo fornecer informação adicional a todos os médicos veterinários e, em especial, aos que praticam a sua actividade no concelho de Vila Franca de Xira. Alerta-se para a necessidade da implementação de campanhas de sensibilização contra o abandono de animais e de promoção à adoção, como vista não só à proteção animal como à proteção da Saúde Pública.

O autor tenciona, no futuro, solicitar apoios financeiros para continuar o estudo da infeção de *L. infantum* em animais errantes no concelho de Vila Franca de Xira, com a proposta de execução de uma completa avaliação clínica e laboratorial e um acompanhamento terapêutico, com vista à promoção do conceito *One Health* e à adoção dos animais.

## 7. Bibliografia

- Abe, N., Sawano, Y., Yamada, K., Kimata, I. & Iseki, M. (2002). Cryptosporidium infection in dogs in Osaka, Japan. *Veterinary Parasitology*, 108 , 185-193.
- AbouLaila, M., Nakamura, K., Govind, Y., Yokoyama, N. & Igarashi, I. (2010). Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on Babesia parasites. *Veterinary Parasitology* 167 , 19-27.
- Adaszek, L., Puchalski, A., Dec, M. & Winiarczyk, S. (2012). Analysis of the culture-derived soluble *Babesia canis canis* antigens derived from the Polish strains of the parasites. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 6 , 399-403.
- Afonso, M., & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I., *Leishmaniose canina* (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Alberti, A., Addis, M.F., Sparagano, O., Zobba, R., Chessa, B., Cubeddu, T. & Parpaglia, M.L. (2005). *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1322-1324.
- Alekseev, A. N., Dubinina, H.V., Antykova, L.P., Dzhivanyan, T.I., Rijpkema, S.G., Kruif, N.V. & Cinco, M. (1998). Tick-borne borrelioses pathogen identification in *Ixodes* ticks (Acarina, Ixodidae) Collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia. *Journal of Medical Entomology* , 35(2), 136-142.
- Alexandre, N., Santos, A.S., Bacellar, F., Boinas, F., Núncio, M.S. & de Sousa, R. (2011). Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (Canis familiaris). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2, 119-122.
- Alexandre-Pires, G., & Correia, J. (2008). Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I., *Leishmaniose canina* (pp. 53-68). Chaves-Ferreira - Publicações, S.A.
- Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves L. & Carvalho, L.M. (2013). Prevalence and seasonal variations on canine heartworm in Portugal. *Triennial Symposium of the American Heartworm Society*, New Orleans, Los Angeles, EUA, Poster 1, Proceedings, pp.38.
- Al-Sabi, M.N.S., Kapel, C.M.O., Johansson, A., Espersen, M. C., Kock, J. & Willelsen, J.L. (2013). A coprological investigation of gastrointestinal and cardiopulmonary parasites in hunting dogs in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 196 , 366–372.
- Anderson, K., Brooks, A.S., Morrison, A.L., Reid-Smith, R.J., Martin, S.W., Benn, D.M. & Peregrine, A.S. (2004). Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic Giardia infections in dogs at a research facility. *The Canadian Veterinary Journal*, 45, 924-930.
- Andrade, H.M., Toledo, V.P.C.P., Pinheiro, M.B., Guimarães, T.M.P.D., Oliveira, N.C., Castro, J.A., Silva, R.N. Amorim, A.C. Brandão, R.M.S.S., Yoko, M., Silva, A.S., Dumont, K., Ribeiro Jr, M.L., Bartchewsky, W. & Monte, S.J.H. (2011). Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 181 , 83-90.
- Andrade, S. F. (2002). *Manual de Terapêutica Veterinária* (2ª edição). São Paulo: Roca.

- Arijo, A.G., Omani, K.T. & Rajput, Z.I. (2007). *Ctenocephalides felis* in dogs and cats in Tandojam Region. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (15), 2579-2582.
- Armés, S.M.M.C. (2010). *Rastreo de Leishmania infantum em cães assintomáticos na região de Mafra*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Ashraf, K., Rafique, S., Hashmi, H.A., Maqbool, A. & Chaudhary, Z.I. (2008). Ancylostomosis and its therapeutic control in dogs. *Journal of Veterinary & Animal Sciences (Lahore)*, 1(1), 40-44.
- Ayoob, A.L., Hackner, S.G. & Prittie, J. (2010). Clinical management of canine babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 77-89.
- Baldrige, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J. & Munderloh, U.G. (2009). Transovarial Transmission of *Francisella*-Like Endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* Variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medicine Entomology*, 46(3), 625-632.
- Ballweber, L. (2012). O Universo em expansão de três parasitas. *Veterinary Medicine-Edição Portuguesa*, 14(82), 25-32.
- Baneth, G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P. & Ferrer L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, 24(7), 324-330.
- Baneth, G. (2010). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections [versão electrónica]. In IVIS, *Proceedings of 35th World small Animal Veterinary Congress WSAVA*, Geneve, Switzerland. Acedido em Fev. 6, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d12.pdf>.
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181, 3-11.
- Barçante, J.M.P., Barçante, T.A., Dias, S.R.C., Vieira, L.Q., Lima, W.S. & Negrão-Corrêa, D. (2003). A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res*, 89, 89-93.
- Barçante, T.A., Barçante, J.M.P., Dias, S.R.C. & Lima, W.S. (2003). *Angiostrongylus vasorum* (Bailliet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology Research*, 91, 471-475.
- Barutzki, D., & Schaper, R. (2011). Results of Parasitological Examinations of Faecal Samples from Cats and Dogs in Germany between 2003 and 2010. *Parasitology Research*, 109, 45-60.
- Becker, A.-C., Rohen, M., Epe, C. & Schnieder, T. (2012). Prevalence of endoparasites in stray and forested dogs and cats in Northern Germany. *Parasitology Research*, 111, 849-857.
- Beiromvand, M., Akhlaghi, L., Massom, S.H.F., Meamar, A.R., Motevalian, A., Oormazdi, H., Razmjou, E. (2013). Prevalence of zoonotic intestinal parasites in domestic and stray dog in a rural area of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 109, 162-167.
- Benito, A., & Carmena, D. (2005). Double-antibody sandwich ELISA using biotinylated antibodies for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. *Acta Tropica*, 95, 9-15.
- Boggiatto, P.M., Corley, N.-C., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K. & Petersen, C.A. (2011). Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *Plos Neglected Tropical Diseases*, Volume, 5 (4), 1-6.

- Bornstein, S., Frössling, J., Näslund, K., Zakrisson, G. & Mörner, T. (2006). Evaluation of a serological test (indirect ELISA) for the diagnosis of sarcoptic mange in red foxes (*Vulpes vulpes*). *European Society of Veterinary Dermatology* , 17, 411-416.
- Bouhsira, E., Lienard, E., Jacquiet, P., Warin, S., Kaltsatos, V., Baduel, L. & Franc, M. (2012). Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs. *Veterinary Parasitology*, 190 , 541– 546.
- Bourque, A.C., Conboy, G., Miller, L.M. & Whitney, H. (2008). Pathological findings in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* in Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , 20, 11-20.
- Bowman, D.D., Eberhard, M.L., Lightowlers, M.W., Little, S.E. & Lynn, R.C. (2009). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (9ª edição). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bowman, D.D., Montgomery, S.P., Zajac, A.M., Eberhard, M.L. & Kazacos, K.R. (2010). Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends in Parasitology*, 26(4), 162-167.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L. & Afonso, M.O. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Tropica*, 125(3) , 339–348.
- Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E.R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G.R., Jittapalapong, S., Moore, D.L. & Stich, R.W. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* 131 , 95-105.
- Bwangamoi, O. (1972). *Angiostrongylus vasorum* and other worms in dogs in Uganda. *The Veterinary Record*, 91(11), 267-268.
- Bwangamoi, O. (1974). Renal, lymphoid and pulmonary lesions in naturally acquired canine angiostrongylosis in Uganda. *Bulletin of epizootic diseases of Africa*, 22(1), 55-68.
- CDC - Epi Info™ 7 (2013). *Centers for disease control and prevention, Atlanta, USA*. Acedido em Fev. 02, 2013, disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>
- Caeiro, V., (1992). As carraças em Portugal: seus hospedeiros domésticos e silvestres. Ciclos vitais e preferências de vegetação e clima. *O Médico Veterinário*, 28, 7-25.
- Caeiros, A.P.S. (2012). *Detecção de Babesia spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no Distrito de Lisboa, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Campillo, M. & Vázquez, F.A. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraW-Hill.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., Costa, Á., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010). Canine babesiose in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors* 3(27). Acedido em Abr. 20, 2013, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-3-27.pdf>.



- Cardoso, L., Mendão, C. & Carvalho, L.M. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Leishmania infantum in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5(62), Acedido em Abr. 5, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353209/pdf/1756-3305-5-62.pdf>.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L. & Sykes, J.E. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal of veterinary internal medicine*, 23, 1129–1141.
- Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M.C., Montoya-Alonso, J.A. (2013). Variation of d-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs. *Veterinary Parasitology*, 195, 106–111.
- Chadwick, J.A.J. (1997). Use of a 0,25 per cent fipronil pump spray formulation to treat canine cheyletiellosis [abstract]. *The Journal of Small Animal Practice*, 38(6), 261, Acedido em Dez. 12, 2012, disponível em: <http://pubget.com/paper/9200117/use-of-a-0-25-per-cent-fipronil-pump-spray-formulation-to-treat-canine-cheyletiellosis>.
- Chalker, V.J. (2005). Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79, 1-8.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37. Acedido em Mar. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695028/>.
- Chee, J.-H., Know, J.-K., Cho, H.-S., Cho, K.-O., Lee, Y.-J., El-Aty, A.M.A. & Shin, S.-S. (2008). A survey of ectoparasite infestations in stray dogs of Gwang-ju City, Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(1), 23-27.
- Claerebout, E., Casaert, S., Dalemans, A.-C., De Wilde, N., Levecke, B., Vercruysse, J. & Geurden, T. (2009). Giardia and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Veterinary Parasitology*, 161, 41-46.
- Compton, S., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B. (2012). Candidatus Mycoplasma haematoparvum and Mycoplasma haemocanis infections in dogs from the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, pp. 557-562.
- Conboy, G. (2004). Natural infections of Crenosoma vulpis and Angiostrongylus vasorum in dogs in Atlantic Canada and their treatment with milbemycin oxime [abstract]. *The Veterinary Record*, 155(1), 16-23. Acedido em Mar. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264484>.
- Conboy, G. (2009). Helminth parasites of the canine and feline respiratory tract [abstract]. *The Veterinary Clinics of North America. Small animal Practice: Biology and Control*, 39(6), 1109-1126. Acedido em Mar. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932366>.
- Conboy, G. (2011). Canine angiostrongylosis: The French heartworm: An emerging threat in North America. *Veterinary Parasitology*, 176, 382-389.
- Cortadellas, O. (2003). Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis[abstract]. *Journal of veterinary internal medicine*, 17(6) 808-811. Acedido em Mai. 14, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14658716>.

- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J. & Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 12-17.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9) 1431-1432.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), 189-196. Acedido em Nov. 22, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575278>.
- Cortese, L., Pelagalli, A., Piantadosi, D., Mastellone, V., Di Loria, A., Lombardini, P., Ciaramella, P. & Avallone, L. (2008). The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*, 177, 405–410.
- Coutinho, M.T.Z., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 149-155.
- Crawford, K., Walton, J., Lewis, D., Tasker, S. & Warman, S.M. (2013). Infections agent screening in canine blood donors in the United Kingdom. *Journal of Small Animal Practice*, 54, 414-417. Acedido em Jan. 03, 2014, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12109/pdf>.
- Crespo, M., Rosa, F. & Almeida, J. (2013). Parasitismo em cães de Óbidos. *Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém*, 2, 292-300. Acedido em Jan. 2, 2014, disponível em: <http://repositorio.ipsantarem.pt/handle/10400.15/642>.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V. & Capelli, G. (2001). A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 102 (3), 243–252. Acedido em Jul. 7, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005295>.
- Currier, R.W., Walton, S.F. & Currie, B.J. (2012). Scabies in animals and humans: history, evolutionary perspectives, and modern clinical management. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1230, 50-60.
- Curtis, C.F. (1996). Use of 0.25 per cent fipronil spray to treat sarcoptic mange in a litter of five-week-old puppies. *The Veterinary Record*, 139(43), 43-46.
- Da Silva, S.M., Rabelo, P.F.B., Gontijo, N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M. & Michalick, M.S.M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology* 174, 150–154.
- Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G. & Lopes, S.T.A. (2011a). Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology*, 128, 347–352.
- Da Silva, A.S., França, R.T., Soares, J.F., Giroto, A., Monteiro, S.G., Labruna, M.B. & Lopes, S.T.A. (2011b). Report of a clinical case of dog infected by *Hepatozoon canis* in Southern Brazil. *Companion Clinical Pathology*, 20, 669–672.

- Dalimi, A., Motamedi, Gh.R., Syavashi, M., Paykari, H. & Hablolvarid, M.H. (2010). Detection of *Echinococcus granulosus* infection in dogs using coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay. *Archives of Razi Institute*, 65(1) , 9-14.
- Dantas-Torres. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary parasitology* 149 , pp. 139-146.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4) , 173–185.
- Dantas-Torres, F. (2010a). Biology and ecology of the brown dog tick. *Parasites & Vectors* , 3 (26), Acedido em Set. 11, 2011, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-3-26.pdf>.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiva-Cavalcanti, M., Figueiredo, L.A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandão-Filho, S.P., Alves, L.C. & Otranto, D. (2010b). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, 106, 857-860.
- Dantas-Torres, F. (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 27(4), 155-159.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Weigl, S., Taralho, D., Lia, R.P. & Otranto, D. (2012). *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitology Research*, 110, 695-698.
- de Freitas, J.C., Nunes-Pinheiro, D.C., Lopes Neto, B.E., Santos, G.J., Abreu, C.R., Braga, R.R., Campos Rde, M. & Oliveira, L.F. (2012). Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(1), 24-33.
- de Freitas, E., Melo, M.N., Costa-Val, A.P. & Michalick, M.S.M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology* , pp. 159-167.
- de la Fuente, J., Ayoubi, P., Blouin, E.F., Almazán, C., Naranjo, V. & Kocan, K.M. (2006a). Anaplasmosis Focusing on Host-Vector-Pathogen Interations for Vaccine Development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 416-423. New York: Blackwell Publishing.
- de la Fuente et al., J. (2006b). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*, 2(24). acedido em Dez. 11, 2011, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-2-24.pdf>.
- de Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 285-94.
- De Tommasi, A.S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B. & de Caprariis, D. (2013). Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasites and Vectors*, 6, 97. Acedido em Jul. 13, 2013, disponível em : <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-6-97.pdf>

- Dedet, J.-P., Carme, B., Desbois, N., Bourdoiseau, G., Lachaud, L. & Pratlong, F. (2013). Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *La Press Médicale*, 42(11), 1469-1481. Acedido em Dez. 20, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0755498213006507>.
- Denk, D., Matiasek, K., Just, F.T., Hermanns, W., Baiker, K., Herbach, N., Steinberg, T. & Fischer, A. (2009). Disseminated angiostrongylosis with fatal cerebral haemorrhages in two dogs in Germany: A clinical case study. *Veterinary Parasitology*, 160, 100–108.
- Desjeaux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect*, 27, 305-18.
- Desjeaux, P. & Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Animals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(1), 3-15.
- Dias, S. R., Cunha, D.E., da Silva, S.M., Dos Santos, H.A., Fujiwara, R.T. & Rabelo, E.M. (2013). Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed dogs. *Parasitology Research*, 112(6), pp. 2151–2157. Acedido em Jul. 7, 2013, disponível em: [http://download.springer.com/static/pdf/7/art%253A10.1007%252Fs00436-013-3370-y.pdf?auth66=1392642545\\_b398600dada217207bbd57397e9523aa&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/7/art%253A10.1007%252Fs00436-013-3370-y.pdf?auth66=1392642545_b398600dada217207bbd57397e9523aa&ext=.pdf)
- Dillingham et al., R. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4(10), 1059-1066. Acedido em Jul. 13, 2013, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457902016301>.
- Dimri, U., Ranjan, R., Kumar, N., Sharma, M.C., Swarup, D., Sharma, B. & Kataria, M. (2008). Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. *Veterinary Parasitology*, 154(1-2), 98-102.
- Direção Geral de Saúde: Direção de Serviços de Epidemiologia e Estatística da Saúde, Divisão de Epidemiologia (2010). *Doenças de declaração obrigatória*. Lisboa: DGS.
- do Nascimento, N., Santos, A.P., Guimaraes, A.M.S., SanMiguel, P.J. & Messick, J.B. (2012). *Mycoplasma haemocanis* - the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary Research*, 43,66. Acedido em Jun. 6, 2013, disponível em: <http://www.veterinaryresearch.org/content/pdf/1297-9716-43-66.pdf>.
- Dreyer, G., Fernandes-Silva, E., Alves, S., Rocha, A., Albuquerque, R. & Addiss, D. (1996). Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2569-2571. Acedido em Out. 20, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229319/pdf/342569.pdf>.
- Dubná, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovská, I., Vadlejch, J., Pekár, S. & Fechtner, J. (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 145, 120-128.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145-2165.

- Dumler, J.S. (2012). The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 64 , 13-20.
- Duque, V., Ventura, C., Seixas, D., Barai, A., Mendonça, N., Martins, J., da Cunha, S. & Meliço-Silvestre, A. (2012). Mediterranean spotted fever and encephalitis: a case report and review of the literature. *Journal of Infection Chemotherapy*, 18, 105–108.
- Ebani, V.V., Bertelloni, F., Turchi, B. & Cerri, D. (2013). Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(2) 289-292.
- Egenvall, A.E., Hedhammar, A.A. & Bjöersdorff, A.I. (1997). Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary Record* , 140(9), 222-228.
- Egenvall, A., Bjöersdorff, A., Lilliehöök, I., Olsson Engvall, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, A. & Gunnarsson, A. (1998). Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *The Veterinary Record* , 143(15), 412-418.
- Endris, R.G., Reuter, V.E., Nelson, J.D. & Nelson, J.A (2000). Efficacy of 65% permethrin applied as a topical spot-on against walking dandruff caused by the mite, *Cheyletiella yasguri* in dogs [abstract]. *Veterinary Therapeutics, Research in Applied Veterinary*, 1(4), 273-282. Acedido em Out. 8, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19757575>.
- Instituto Nacional de Estatística: Censos Definitivos (2011). Acedido em Dez. 10, 2012, disponível em: <http://www.ine.pt/>
- Estrada-Peña, A., Ayllón, N., de la Fuente, J. (2012). Impact of Climate trends on tick-borne pathogen. *Frontiers in Physiology*, 3, 64. Acedido em Fev. 16, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3313475/>.
- Faria, T.C.P. (2008). *Estudo sero-epidemiológico da infecção por Leishmania infantum em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de Imunofluorescência Indirecta (IFAT)*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A. & Dubey, J.P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*, 87(6), 1415-1436.
- Ferdushy, T., Kapel, C.M.O., Webster, P., Al-Sabi, M.N.S. & Grønvold, J. (2009). The occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in terrestrial slugs from forests and parks in the Copenhagen area, Denmark. *Journal of Helminthology*, 83(4), 379-383.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A. & Ferrer, L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, 135 , 181–185.
- Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 165 , 150–154.
- Ferreira, F.S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távira, L.T., Atougua, J. & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 179, 242-245.

- Ferreira, M.F. (2008). *Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Figueiredo, T.C.D.(2008). *Estudo de prevalência de doenças associadas a vectores em canídeos domésticos do Distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina - Universidade de Lisboa
- Fondati, A., De Lucia, M., Furiani, N., Monaco, M., Ordeix, L. & Scarampella, F. (2009). Prevalence of *Demodex canis*-positive healthy dogs at trichoscopic examination. *Veterinary Dermatology* , 21, 146-151.
- Fourie, J.J., Stanneck, D. & Jongejan, F., (2013). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated with an imidacloprid/flumethrin collar. *Veterinary Parasitology*, 192, 273-278.
- França-Silva, J., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O. & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 111, 161-173.
- Franco, S., Pereira, O., Pereira da Fonseca, I., Santos-Gomes, G. & Ferreira, F. (2012). Análise da citotoxicidade de fluoroquinolonas em promastigotas de *Leishmania infantum*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 19(1-2), 25-30.
- Franssen, F., Nijse, R., Mulder, J., Cremers, H., Dam, C., Takumi, K. & van der Giessen, J. (2014). Increase in number of helminth species from Dutch red foxes over 35-year period. *Parasites & Vectors*, 7:166.
- Fritz, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106(6), 1339–1342.
- Galaviz-Silva, L., Pérez-Treviño, K.C., Molina-Garza, Z.J. (2013). Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Experimented and Applied Acarology*, 61, 491-501.
- Gallagher, B., Brennan, S.F., Zarelli, M., Mooney, C.T. (2012). Geographical, clinical, clinicopathological and radiographic features of canine angiostrongylosis in Irish dogs: a retrospective study. *Irish Veterinary Journal* , 65(1), 5.
- Gaunt, S.D., Beall, M.J., Stillman, B.A., Lorentzen, L., Diniz, P.P.V.P., Chandrashekar, R., Breitschwerdt (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 3, 33. Acedido em Nov. 10, 2013, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-3-33.pdf>.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163 , 286–292.
- Genchi, C., Venco, L. & Genchi, M. (2000). "Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections" In *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. 139-144.
- Giennelli, A., Ramos, R.A.N., Paola, G.D., Mencke, N., Dantas-Torres, F., Baneth, G. & Otranto, D. (2013). Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 196 , 1-5.

- Goddard, A., Wiinberg, B., Schoeman, J.P., Kristensen, A.T. & Kjelgaard-Hansen, M. (2013). Mortality in virulent canine babesiosis is associated with a consumptive coagulopathy. *The Veterinary Journal*, 196, 213-217.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F., Couto, C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal*, 179, 259–263.
- Gong, B., Ma, L., Liu, Y., Gong, Q., Shelite, T., Bouyer, D., Boor, P.J., Lee, Y.S., Oberhauser, A. (2012). Rickettsiae induce microvascular hyperpermeability via phosphorylation of VE-Cadherins: evidence from atomic force microscopy and biochemical studies. *PLOS - Neglected Tropical Diseases*, 6(6), 1699.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. & Simón, F. (2013). Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Veterinary Parasitology*, 196, 235–240.
- Goo, Y.-K., terkawi, M.A.m Jia, H., Aboge, G.O., Ooka, H., Nelson, B., Kim, S., Sunaga, F., Namikawa, K., Igarashi, I., Nishikawa, Y. & Xuan, X. (2010). Artesunate, a potential drug for treatment of *Babesia* infection. *Parasitology International*, 59, 481–486.
- Gossage, S.M., Rogers, M.E. & Bates, P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal of Parasitology*, 33(10), 1027-1034.
- Gracenea, M., Gómez, M.S. & Torres, J. (2009). Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *Acta Parasitológica, Versita*, 54(1), 73-77. Acedido em Dez. 12, 2013, disponível em: [http://download.springer.com/static/pdf/607/art%253A10.2478%252Fs11686-009-0005-7.pdf?auth66=1392674734\\_0bd713a632668ce1afacf673d6d0c491&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/607/art%253A10.2478%252Fs11686-009-0005-7.pdf?auth66=1392674734_0bd713a632668ce1afacf673d6d0c491&ext=.pdf).
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, pp. 23– 30.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35, 1169–1180.
- Granick, J.L., Armstrong, P.J. & Bender, J.B. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Acedido em Mar. 12, 2012, disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/593232/>.
- Gredal, H., Willesen, J.L., Jensen, H.E., Nielsen, O.L., Kristensen, A.T., Koch, J., Kirk, R.K., Pors, S.E., Skerrett, G.C. & Berendt, M. (2011). Acute neurological signs as the predominant clinical manifestation in four dogs with *Angiostrongylus vasorum* infections in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 43.
- Greene, C.E., Kidd, L. & Breitschwerdt, E. (2006). Rocky mountain and mediterranean spotted fevers, cat-flea Typhuslike illness, Rickettsialpox, and Typhus, In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd ed.) (pp. 232-45). Philadelphia: WB Saunders Co.

- Greig, B. & Armstrong, P. (2006). Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 219-224). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Griffiths, J., Griffiths, J.K., Balakrishnan, R., Widmer, G. & Tzipori, S. (1998a). Paromomycin and genetic inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implicatins for drug delivery. *Infection and immunity*, 66(8), 3874-83.
- Griffiths, J.K., Theodos, C., Paris, M. & Tzipori, S. (1998b). The gamma interferon gene knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Clinical Microbiology* , 36(9), 2503–2508.
- Gunnarsson, E. Hersteinsson, P. & Adalsteinsson, S. (1991). Prevalence and Geographical Distribution of the Ear Canker Mite (*Otodectes cynotis*) Among Arctic Foxes (*Alopex lagopus*) in Iceland. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(1), 105-109.
- Habluetzel, A., Traldi, G., Ruggieri, S., Attili, A.R., Scuppa, P., Marchetti, R., Menghini, G. & Esposito, F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4) , 243–252.
- Hajdušek, O., Ditrich, O. & Slapeta, J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122 (3) , 183–192.
- Halos, L., Lebert, I., Chao, I., Vourc'h, G., Ducrot, C., Abrial, D., Ravier, J.-F. & Guillot, J. (2013). Questionnaire-based survey on distribution and clinical incidence of canine babesiosis in France. *BMC Veterinary Research*, 9:41.
- Hamel, D., Silaghi, c., Zapadynska, S., Kudrin, A. & Pfister, K. (2013). Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples colleted from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4, 152-155.
- Hamnes, I.S., Gjerd, B.K. & Robertson, L.J. (2007). A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1): 22.
- Hanssen, I., Mencke, N., Asskildt, H., Ewald-Hamm, D., & Dorn, H. (Abtil de 1999). Field study on the insecticidal efficacy of Advantage against natural infestations of dogs with lice. *Parasitology research* , pp. 347-8.
- Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H. & Bark, H. (1996). Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 66(3-4), 241-249.
- Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E. & Bark, H. (1997a). Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *The Veterinary Record* , 141(10) 247-50.
- Harrus, S., Kass, P.H., Klement, E., Waner, T. (1997b). Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*, 141(14), 360-362.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I. & Bark, H. (1998). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 2140-2141.



- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T. & Shaw, S. (2004). Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4488-4290.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292–296.
- Harvey, J. W. (2001). *Atlas Veterinary Hematology - Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. W. B. Saunders Co.
- Helm et al, J. (2009). A case of canine *Angiostrongylus vasorum* in Scotland confirmed by PCR and sequence analysis. *Journal Small Animal Practice*.
- Helm, J. R., Morgan, E.R., Jackson, M.W., Wotton, P. & Bell, R. (2010). Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 98-109.
- Herwick. (1978). *Otodectes cynotis* infestation. *Archives of Dermatology*, 114,130.
- Heukelbach, J., Frank, R., Ariza, L., Lopes I.S., de Assis, E., Silva, A., Borges, A.C., Limongi, J.E., de Alencar, C.H. & Klimpel, S. (2012). High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). *Parasitology Research*, 111(5) 1913-1921.
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J. & Straube, E. (2007). First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(8), 595-601.
- Hillier, A., & Desch, C. (2001). Large-bodied *Demodex* mite infestation in 4 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(5), 623-629.
- Hodzic, E., Fish D., Maretzki, C.M., De Silva, A.M., Feng, S. & Barthold, S.W. (1998). Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of clinical microbiology*, 36(12), 3574-3581.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A. & Gray, J.S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology* 38(11), pp. 1219–1237.
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Marques, F.J., Lima, V.M.F., Morinishi, C.K., Bonello, F.L., Zanette, M.F., Perri, S.H.V. & Feitosa, M.M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology* 143(3-4), 254–259.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera: Boletins Climatológicos (Outubro de 2011 a Setembro 2012). Acedido em Dez. 13, 2013, disponível em: <http://www.ipma.pt/>.
- Interactive Chi-Square Tests - Kristopher J. Preacher (2013). *Calculation for the Qui-Square Test*. Nashville, USA. Acedido em Jan. 21, 2013, disponível em: <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>.
- Irwin, P. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(1): 24.
- Irwin, P. (2002). Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology* 32(5), 581–593.

- Irwin, P. (2007). PUPS, PCRs and Platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections of dogs in Australia and overseas. *Proceedings of the WSAVA Congress*. Sydney, Australia.
- Irwin, P., & Jefferies, R. (2004). Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. *Trends in Parasitology*, 20(1), 27-34.
- Jittapalapong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J.J. & Stich, R.W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Annual New York Academy of Science*, 1081, 479-488.
- Júlio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., Nunes, B., Tenreiro, R. & Angelo, H. (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites & Vectors*, 5:22. Acedido em Jun. 14, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275531/>.
- Katagiri, S., & Oliveira-Sequeira, C. (2008). Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo state Brazil. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10), 406-413.
- Keiser, P., & Nutman, T. (2004). *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 208-217.
- Keysary, A., & Strenger, C. (1997). Use of enzyme-linked immunosorbent assay techniques with cross-reacting human sera in diagnosis of murine typhus and spotted fever. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 1034-1035.
- Khayatnouri, M., & Garedaghi, Y. (2012). Efficacy of ivermectin pour-on administration against natural *Toxascaris leonina* infestation in native dogs. *World Journal of Zoology*, 7(1), 12-16. Acedido em Jun 24., 2013, disponível em : [http://idosi.org/wjz/wjz7\(1\)12/3.pdf](http://idosi.org/wjz/wjz7(1)12/3.pdf).
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M.P. & Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 11(2), 105-111.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279-289.
- Kim, K.U., Park, S.K., Kang, S.A., Park, M.K., Cho, M.K., Jung, H.J., Kim, K.Y. & Yu, H.S. (2013). Comparison of functional gene annotation of *Toxascaris leonina* and *Toxocara canis* using CLC genomics workbench. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(5), 525-530.
- Kimura, A., Morishima, Y., Nagahama, S., Horikoshi, T., Edagawa, A., Kawabuchi-Kurata, T., Sugiyama, H. & Yamasaki, H. (2013). A coprological survey of intestinal helminthes in stray dogs captured in Osaka Prefecture, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75(10), 1409-1411
- Klimpel, S., Heukelbach, J., Pothmann, D. & Rückert, S. (2010). Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? *Parasitology Research*, 107(3), 713-719.
- Knots, B., & Takken, W. (2007). Alarm bells ringing more of the same, and new and novel diseases and pests. In B. Knots, & W. Takken, *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe* (pp. 13-19). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. Acedido em Jan. 12, 2012, disponível em: [http://www.wageningenacademic.com/\\_clientFiles/download/ecvd-01-e.pdf](http://www.wageningenacademic.com/_clientFiles/download/ecvd-01-e.pdf).

- Koch, H. G., & Tuck, M. D. (1986). Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(1), 11-14.
- Kock, J., & Willesen, J. (2009). Canine pulmonary angiostrongylosis: An update. *The Veterinary Journal*, 348-359.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1289-1295. Acedido em Fev. 19, 2013, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0180.x/pdf>.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G. & Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 71-76.
- Kommenou, A.A., Mylonakis, M.E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., Dessiris, A., Koutinas, A.F. & Ofri, R. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3) pp. 137-142.
- Kordick, S., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., Mcpherson, J.T. & MacCormack, J.N. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(88), 2631-2638.
- Krolewiecki, A., Lammie, P., Jacobson, J., Gabrielli, A.F., Levecke, B., Socias, E., Arias, L.M., Sosa, N., Abraham, D., Cimino, R., Echazú, A., Crudo, F., Vercruysse, J. & Albonico, M. (2013). A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(5): e2165 .
- Kubelová, M., Sedlák, K., Panev, A. & Široký, P. (2013). Conflicting results of serological, PCR and microscopic methods clarify the various risk levels of canine babesiosis in Slovakia: A complex approach to *Babesia canis* diagnostics. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 353-357.
- Kuznetsova, E., Bettenay, S., Nikolaeva, L., Majzoub, M. & Mueller, R. (2012). Influence of systemic antibiotics on the treatment of dogs with generalized demodicosis. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 148-155.
- Lebre, F.L.M.C.R. (2011). Rastreo de parasitas gastrointestinais e seu impacto zoonótico em cães de canilda cidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Labruna, M., Jorge, R.S., Sana, D.A., Jácomo, A.T., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., Ferro, C., Perez, S.A., Silveira, L., Santos, T.S.Jr., Marques, S.R., Morato, R.G., Nava, A., Adania, C.H., Teixeira, R.H., Gomes, A.A., Conforti, V.A., Azevedo, F.C., Prada, C.S., Silva, J.C., Batista, A.F., Marvulo, M.F., Morato, R.L., Alho, C.J., Pinter, A., Ferreira, P.M., Ferreira, F. & Barros-Battesti, D.M. (2005). Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 36(1-2), 149-163.
- Lappin, M. R. (2010). Update on the diagnosis and management of *Hepatozoon* spp. infections in dogs in the United States. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 142-144.
- Lee, A.C., Montgomery, S.P., Theis, J.H., Blagburn, B.L. & Eberhard, M.L. (2010). Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends in Parasitology*, 26(4), 168-173.

- Lehtinen, L., Birkenheuer, A.J., Droleskey, R.E., Holman, P.J. (2008). In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 150-157.
- Leite, L.C., Luz, E., Cirio, S.M., Leite, M.C., Molinari, H.P., Zadorosnei, A.C.B., Oliveira, T.M.F.S. & Leite, S.C., (2012). Infection in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) from Guaratuba, Paraná, Brazil by circulating microfilariae of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889). *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 33(3), 1149-1156. Acedido Set. 22, 2013, disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/8970/10849>.
- Lepri, E., Veronesi, F., Traversa, D., Conti, M.B., Marchesi, M.C., Miglio, A. & Mandara, M.T. (2011). Disseminated angiostrongylosis with massive cardiac and cerebral involvement in a dog from Italy. *Parasitology Research*, 109(2), 505–508.
- Lillini, E., Macrì, G., Proietti, G. & Scarpulla, M. (2006). New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *New York Academy of Sciences*, 1081, 360-370.
- Lima, W.S., Guimaraes, M.P. & Lemos, I.S. (1994). Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of the Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. *Journal of Helminthology*, 68(1): 87.
- Lindo, J.F., Atkins, N.S., Lee, M.G., Robinson, R.D. & Bundy, D.A. (1996). Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 702-703.
- Little, S., Hostetler, J. & Kocan, K. (2007). Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology*, 150, 139–145.
- Liu, C., Yang, N., He, J., Yang, M. & Sun, M. (2013). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Shenyang, Northeastern China. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(3), 375-377.
- Loft, K., & Willesen, J. (2007). Efficacy of imidacloprid 10 per cent/moxidectin 2-5 per cent spot-on in the treatment of cheyletiellosis in dogs. *The Veterinary Record*, 160, 528-529.
- Lopez, R. (1993). Of mites and man. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203(5) 606-7.
- Louly, C.C.B., Soares, S.F., Silveira, D.N., Neto, O.J.S., Silva, A.C. & Borges, L.M.F. (2009). Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *International Journal of Acarology*, 35(1), 25-32.
- Lower, K.S., Medleau, L.M., Hnilica, K. & Bigler, B. (2001). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in dogs. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 315-320.
- Lund, J.D., Agger, J.F. & Vertergaard, K.S. (1996). Reported behaviour problems in pet dogs in Denmark: age distribution and influence of breed and gender. *Preventive Veterinary Medicine*, 28(1), 33-48.
- Machado, R.Z., André, M.R., Werther, K., de Sousa, E., Gavioli, F.A. & Alves Junior, J.R. (2012). Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(8), 705-708.
- Madeira de Carvalho, L.M., Pereira da Fonseca, I.M., Gomes, L. & Meireles, J.M. (2009). Lungworms in domestic and wild carnivores in Portugal: rare parasites or rarely diagnosed. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p.28. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.

- Magalhães, R., & Mateus, T. (2012). Desparasitação interna de cães - o que sabem os proprietários de Ponte de Lima. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 19(1-2), 31-34.
- Magi, M., Calderini, P., Gabrielli, S., Dell'Omodarme, M., Macchioni, F., Prati, M.C. & Cancrini, G. (2008). *Vulpes vulpes*: a possible wild reservoir for zoonotic filariae. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(1), 249-252.
- Magi, M., Guardone, L., Prati, M.C., Mignone, W. & Macchioni, F. (2014). Extraintestinal nematodes of red fox *Vulpes vulpes* in north-west of Italy. *Journal of helminthology*, 1: 1-6.
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J. & Deplazes, P. (2013). Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6:48. Acedido em Ago. 20, 2013, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-6-48.pdf>.
- Maia, C., Rolão, N., Nunes, M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2007). Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, 103(2), 150–155.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 555-559.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4), 336–340.
- Maia, C., Nunes, M., Marques, N., Henriques, S., Rolão, N. & Campino, L. (2013a). In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Experimental Parasitology*, 135(1), 36-41. Acedido em Dez. 28, 2013, disponível em: [http://ac.els-cdn.com/S0014489413001550/1-s2.0-S0014489413001550-main.pdf?\\_tid=76b9553c-9749-11e3-af6c-00000aabb0f01&acdnat=1392582933\\_f0c505a403e999d02e46859792679a83](http://ac.els-cdn.com/S0014489413001550/1-s2.0-S0014489413001550-main.pdf?_tid=76b9553c-9749-11e3-af6c-00000aabb0f01&acdnat=1392582933_f0c505a403e999d02e46859792679a83).
- Maia, C., Nogueira, J., Mendão, C. & Cardoso, L. (2013b). Giardiose canina em Portugal - prevalência de infecção por *Giardia duodenalis* em cachorros com alterações intestinais. *Veterinary Medicine*, 15(90), 49-53.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274–287.
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in parasitology*, 27(8), pp. 341–344.
- Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*, 46(1-2), ( 203-206.
- Manzillo, F.V., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M. & Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, 142(1-2), 142-145.
- Manzillo, V.F., Paparcone, R., Cappiello, S., De Santo, R., Bianciardi, P. & Oliva G. (2009). Resolution of tongue lesions caused by *Leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasites & Vectors*, 2(1): S6. Acedido em Dez. 29, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2679398/>.

- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 357–360.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Paltrinieri, S., Roura, X., Zini, E. & Zatelli, A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1200-1206.
- Martínez-Moreno, F.J., Hernández, S., López-Cobos, E., Becerra, C., Acosta, I. & Martínez-Moreno, A. (2007). Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology*, 143(1), 7-13.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 267–273.
- Masnfield, L., & Schad, G. (1992). *Strongyloides stercorais* infection in IgA-deficient dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(6), 830-836.
- Masucci, M., De Majo, M., Contarino, R.B., Borruto, G., Vitale, F. & Pennisi, M.G. (2003). Canine Leishmaniasis in the Newborn Puppy. *Veterinary Research Communications*, 27(1), 771-774..
- Matijatko, V., Torti, M. & Schetters, T.P. (2012). Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends in Parasitology*, 28(3), 99-105.
- Matijala, P., Leisewitz, A.L., Jongejan, F. & Penzhorn, B.L. (2008). Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2), 152–157.
- Matijala, P.T., Carcy, B., Leisewitz, A.L., Schetters, T., Jongejan, F., Gorenflot, A. & Penzhorn, B.L. (2009). Preliminary evaluation of the BrEMA1 gene as a tool for associating *Babesia rossi* genotypes and clinical manifestation of canine babesiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3586–3592.
- Medleau, L., & Hnilica, K. A. (2003). *Dermatologia de pequenos animais- atlas colorido e guia terapêutico* (1ª ed.). São Paulo: Roca.
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose canina* (pp. 93-104). Lisboa: Chaves-Ferreira - Publicações, S.A.
- Melo, A.L., Martins, T.F., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Pacheco, R.C., Labruna, M.B., Aguiar, D.M. (2011). Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2(4), 213-218.
- Melo, G.D., Seraguci, T.F., Schweigert, A., Silva, J.E., Grano, F.G., Peiró, J.R., Lima, V.M. & Machado, G.F. (2013). Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3), 57-66.
- Menelaos, L., & Smaragda, K. (2006). Prevalence of hookworm parasites in dog from the area of Thessaloniki and their zoonotic importance. *Buletinul Universitatii de Stiinte Agricole si Medicina Veterinaria Cluj Napoca, Seria Medicina Veterinaria*, 63, 297-303. Acedido em Dez. 10, 2013, disponível em: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/viewFile/2498/2474>.

- Messick, J.B., Walker, P.G., Raphael, W., Berent, L. & Shi, X. (2002). '*Candidatus mycoplasma haemodidelphidis*' sp. nov., '*Candidatus mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16SrRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 693–698. Acedido em Out. 10, 2011, disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/52/3/693.full.pdf>
- Messick, J. (2003). New perspectives about hemotrophic *Mycoplasma* (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(6), 1453-1465.
- Mikaeili, F., Kia, E.B., Sharbatkhori, M., Sharifdini, M., Jalalizand, N., Heidari, Z., Zarei, Z., Stensvold, C.R. & Mirhendi, H. (2013). Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from *Toxocara* and *Toxascaris* nematodes. *Experimental Parasitology*, 134(2), 155–159.
- Miller, J.W.H., de Jaham, C., Scott, D.W., Cayatte, S.M., Bagladi, M.S. & Buerger, R.G. (1996). Treatment of canine scabies with milbemycin oxime. *The Canadian Veterinary Journal*, 37(4), 219-221. Acedido em Nov. 11, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1576356/pdf/canvetj00101-0029.pdf>.
- Miotti, P., Gilman, R. S., Ryder, R., & Yolken, R. (1986). Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6), 972-975.
- Mircean, V., Györke, A. & Cozma, V. (2012). Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4), 325-329.
- Miró G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J. & Molina, R. (2007a). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitology Research*, 101(2), 253–257.
- Miró, G., Mateo, M., Montoya, A., Vela, E. & Calonge, R. (2007b). Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 100(2), 317-320.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R. & Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agentes of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & Vectors*, 6, 117.
- Molina, R., Miró, G., Gálvez, R., Nieto, J. & Descalzo, M.A. (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *The Veterinary Record*, 159(7), 206-209.
- Molina, R., Espinosa-Góngora, C., Gálvez, R., Montoya, A., Descalzo, M.A., Jiménez, M.I., Dado, D. & Miró, G. (2012). Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), 529-533.
- Monteiro, L.C., de Souza, J.R., de Albuquerque, C.M. (2007). Eclosion rate, development and survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) under different water temperatures. *Neotropical Entomology*, 36(6), 966-971.
- Montoya-Alonso, J.A., Mellado, I., Carretón, e., Cabrera-Pedrero, E.D., Morchón, R. & Simón, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 107, 1265-1269.

- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J. & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3(196), 75-85, Acedido em Out 7, 2013, disponível em <http://www.readcube.com/articles/10.3389/fphys.2012.00196?locale=en>
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399-405.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.M. & Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (Canileish) stimulates an appropriate Th-1 dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1683.
- Morgan, E., & Shaw, S. (2010). *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and developments in diagnosis and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 51(12), 616–621.
- Mortarino, M., Musella, V., Costa, V., Genchi, C., Cringoli, G. & Rinaldi, L. (2008). GIS modeling for canine dirofilariosis risk assessment in central Italy. *Geospatial Health*, 2(2), 253-261.
- Mosallanejad, B., Alborzi, A. & Katvandi, N. (2012). A survey on ectoparasite infestations in companion dogs of Ahvaz District, South-west of Iran. *Journal Of Arthropod-Borne Diseases*, 6(1), pp. 70-78.
- Mueller, R.S., Bettenay, S.V. & Shipstone, M. (2001 ). Value of the pinna-pedal reflex in the diagnosis of canine scabies. *The Veterinary Record*, 148(20), 621-623.
- Mueller, R.S., & Bettenay, S.V. (2002). Efficacy of selamectin in the treatment of canine cheyletiellosis. *The Veterinary Record*, 151(25): 773.
- Mueller, R.S. (2004). Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. *Veterinary Dermatology*, 15(2), 75-89.
- Mueller, R.S. (2012). An update on the therapy of canine demodicosis. *Compendium (Yardley, PA)*, 34(4), 1-4.
- Mylonakis, M.E., Leontides, L., Gonen, L., Billinis, C., Koutinas, A.F. & Baneth, G. (2005). Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring. *Veterinary Parasitology*, 129(3-4), 229–233.
- Nabais, J., Gomes, L., Ferreira da Silva, J., Vicente, G. & Madeira de Carvalho, L. (2012). *Angiostrongylus vasorum* e *Aelurostrongylus abstrusus*: infection status in domestic dogs and cats from Lisboa, Portugal, 21-22 June 2012. Parma, Italy: Third European *Dirofilaria* Days.
- Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5:67.
- Navarro, J.A., Sánchez J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4), 297-302.
- Nelson, R.W & Couto, C.G. (2001). *Medicina Interna de Pequenos Animais* (2ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Nováková, M., & Víchová, B. (2010). Granulocytic anaplasmosis — emerging tick-borne disease of humans and animals. *Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Biologia* 65 (6), 925-931.



- Ogden, N.H., Bown, K., Horrocks, B.K., Woldehiwet, Z. & Bennett, M. (1998). Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(4), 423-429.
- Ogden, N.H., Lindsay, L.R., Beauchamp, G., Charron, D., Maarouf, A., O'Callaghan, C.J., Waltner-Toews, D. & Barker, I.K. (2004). Investigation of relationships between temperature and developmental rates of tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 622-633.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. & Gradoni, L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1318-1322.
- Oliveira-Júnior, S.D., Barçante, J.M., Barçante, T.A., Ribeiro, V.M. & Lima, W.S. (2004). Ectopic location of adult worms and first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dog. *Veterinary Parasitology*, 121(3-4), pp. 293-296.
- Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A. & Thompson, R.C. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20(4), 185-191.
- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G. & Stanneck, D. (2008). Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 320-328.
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3:2. Acedido em Set. 10, 2011, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-3-2.pdf>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Stanneck, D., Decaprariis, D., Capelli, G. & Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites and Vectors*, 4:55. Acedido em Set. 14, 2011, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-4-55.pdf>.
- Overgaauw, P.A. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(3), 215-31.
- Overgaauw, P.A., van Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F.O., Roelfsema, J., Pinelli, E., van Knapen, F. & Kortbeek, L.M. (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), 115-122.
- Overgaauw, P., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 398-403.
- Palmer, C.S., Traub, R.J., Robertson, I.D., Devlin, G., Rees, R. & Thompson, R.C. (2008). Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 154(1-2), pp. 142-147.
- Paltrinieri, S., Ravicini, S., Rossi, G. & Roura, X. (2010). Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal (London, England: 1997)* 186, 393-395.
- Pantchev, N., Etzold, M., Daugschies, A. & Dyachenko, V. (2011). Diagnosis of imported canine filarial infections in Germany 2008-2010. *Parasitology Research*, 109(1), 61-76.

- Papazahariadou, M., Saridomichelakis, M., Koutinas, A., Papadopoulos, E., & Leontides, L. (2003). Tick infestation of dogs in Thessaloniki, Northern Greece. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), 110-113.
- Papazahariadou, M., Founta, A., Papadopoulos, E., Chliounakis, S., Antoniadou-Sotiriadou, K. & Theodorides, Y. (2007). Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 170–173.
- Paul, M., King, L. & Carlin, E.P. (2010). Zoonoses of people and their pets: a US perspective on significant pet-associated parasitic diseases. *Trends in Parasitology*, 26(4), 153-154.
- Pennisi, M.G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F., Del Maso, R. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *The Veterinary Record*, 156(11), 346-349.
- Pennisi, M.G., Capri, A., Solano-Gallego, L., Lombardo, G., Torina, A. & Masucci, M. (2012). Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5-6), 315-318.
- Pereira da Fonseca, I.M., Pereira, M.A., Villa de Brito, M.T., João, A., Pereira, N., Alexandre-Pires, G., Santos-Gomes, G. (2007). Canine Leishmaniosis: susceptibility of autochthonous and imported breeds in endemic areas. *Journées Scientifiques de l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales*, 30 May -1 June 2007, (pp. 35), Alfort - França.
- Pereira, M. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I., *Leishmaniose Canina* (pp. 41-52). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia Canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Science*, 1078, 110-117.
- Pissarra, H.; Santos, C.; Gomes, L. & Madeira de Carvalho, L. (2006). Pneumonia em cão por *Angiostrongylus vasorum*: um parasita raro ou raramente diagnosticado? *X Congresso Português de Parasitologia, Sociedade Portuguesa Parasitologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, Lisboa, 23 e 24 de Novembro.
- Pitorri, F., Dell'Orco, M., Carmichael, N., Barker, E.N., Hollywood, M. & Tasker, S. (2012). Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 493-496.
- Plier, M.L. Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Kidd, L.B. (2009). Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(5), 232-238.
- Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J. & Shukla, S.K. (2005). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 796–801.
- Postigo, I., Martinez, J. & Guisantes, J.A. (2006). *Uncinaria stenocephala*: Assessment of antigens for the immunodiagnosis of canine uncinariosis. *Experimental Parasitology*, 114(3), pp. 215–219.
- R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. Acedido em Dez. 10, 2012, disponível em: <http://www.r-project.org/>.

- Rani, P.A.M.A., Irwin, P.J., Gatne, M., Coleman, G.T., McInnes, L.M. & Traub, R.J. (2010). A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & Vectors*, 3:30.
- Raoult, D., & Drancourt, M. (1991). Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12), 2457-2462. Acedido em Jan. 18, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC245412/pdf/aac00056-0033.pdf>.
- Rar, V. & Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), pp. 1842–1861.
- Ravera, I., Altet, L., Francino, O., Bardagí, M., Sánchez, A. & Ferrer, L. (2011). Development of a real-time PCR to detect *Demodex canis* DNA in different tissue samples. *Veterinary Research*, 108(2), 305-308.
- Reiczigel, J., Földi, J. & Ózsvári, L. (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*, 138(11), 1674-1678.
- Reifur, L., Thomaz-Soccol, V. & Montiani-Ferreira, F. (2004). Epidemiological aspects of filariasis on the coast of Paraná state, Brazil with emphasis on *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 122(4), 273-286.
- Reine, N. (2004). Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 19(2), 68-74.
- René-Martellet, M., Chêne, J., Chabanne, L., Chalvet-Monfray, K. & Bourdoiseau, G. (2013). Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: results of a multiregional study. *Veterinary Parasitology*, 197(1-2), 50-58.
- Renvoisé, A., & Raoult, D. (2009). An update on rickettsiosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 39(2), 71-81.
- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A. & Muller, C.P. (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2923–2931.
- Reyes, M.M., Taramona C.P., Saire-Mendoza, M., Gavidia, C.M., Barron, E., Boufana, B., Craig, P.S., Tello, L., Garcia, H.H. & Santivañez, S.J. (2012). Human and canine echinococcosis infection in informal, unlicensed abattoirs in Lima, Peru. *PLOS - Neglected Tropical Diseases*, 6(4), e1462. Acedido em Fev. 16, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317905/>.
- Riggio, F., Mannella, R., Ariti, G. & Perrucci, S. (2013). Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from Central Italy. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 78-84. Acedido em Dez. 20, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712006115>.
- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Review*, 4(3), 286-308.
- Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Musella, V., Veneziano, V., Carbone, S., Di Sarno, A., Paone, M. & Cringoli, G. (2008). *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 413-415.

- Rodriguez-Vivas, R.I., Ortega-Pacheco, A., Rosado-Aguilar, J.A. & Bolio, G.M. (2003). Factors affecting the prevalence of mange-mite infestations in stray dogs of Yucatán, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 115(1), 61-65.
- Rossignol, J.-F. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology*, 124(1), 45-53.
- Rosychuk, R. (1994). Management of otitis externa. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 25(5), 921-52.
- Rosypal, A., & Lindsay, D. (2005). Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *The Journal of Parasitology*, 91(5), 1113-1115.
- Rougeron, V., Catzefflis, F., Hide, M., De Meeûs, T. & Bañuls, A.L. (2011). First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. *Veterinary Parasitology*, pp. 325-332.
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Pérès, S. & Woehrlé, F. (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 244–254.
- Rougier, S., Hasseine, L., Delaunay, P., Michel, G. & Marty, P. (2012). One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 245– 253.
- Rovero, C., Brouqui, P. & Raoult, D. (2008). Questions on mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1360-1367.
- Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M. & Harrus, S. (2012). Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(1), 226-233.
- Saeed, I., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J. & Kapel, C.M. (2006). Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 168–179.
- Sakuma, M., Setoguchi, A. & Endo, Y. (2009). Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 493–498.
- Samn, K. (2012). A survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in rural and urban community in North Delta, Egypt. *New York Science Journal*, 5(3), 49-54. Acedido em Mar. 5, 2013, disponível em: [http://www.sciencepub.net/newyork/ny0503/005\\_8457ny0503\\_49\\_54.pdf](http://www.sciencepub.net/newyork/ny0503/005_8457ny0503_49_54.pdf).
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F. & Dumler JS. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira island and Setúbal district, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643-1648.
- Santos, A.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2008). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 46-47.
- Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *The Veterinary Record*, 164(6), 168-171.

- Santos-Gomes, G., & Pereira da Fonseca, I. (2008). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações.
- Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, A.S., Lopes, D., Queijo E., Doreta A., Vitorino L. & Bacellar F. (2006). Ticks and tick-borne Rickettsiae surveillance in Montesinho Natural Park, Portugal. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1078, 137-142.
- Santos-Silva, M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari:Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental Applied Acarology*, 55(1), 85-121.
- Savilla, T.M., Joy, J.E., May, J.D. & Somerville, C.C. (2011). Prevalence of dog intestinal nematode parasites in south central West Virginia, USA. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), 115-120.
- Schaarschmidt, D., Gilli U., Gottstein, B., Marreros, N., Kuhnert, P., Daepfen, J.A., Rosenberg, G., Hirt D. & Frey, C.F. (2013). Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(4), 334-340.
- Schicht, S., Schnieder, T. & Strube, C. (2012). *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard tick from Northern Germany. *Journal of Medical Entomology*, 49(3), 766-771.
- Schnieder, T. Laabs, E.M. & Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175 (3-4), 193-206.
- Schnittger, L. Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M. & Morrison, D.A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(8), 1788–1809.
- Schnyder, M., Fahrion, A., Ossent, P., Kohler, L., Webster, P., Heine, J. & Deplazes, P. (2009). Larvicidal effect of imidacloprid/moxidectin spot-on solution in dogs experimentally inoculated with *Angiostrongylus vasorum*. *Veterinary Parasitology*, 166(3-4), 326–332.
- Scott, D.W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. (2001). Parasitic skin diseases. In *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (6<sup>th</sup> ed.), (pp. 423-516). Philadelphia: Saunders Company.
- Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T. & Harrus, S. (2008). Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 153(1-2), 131–138.
- Sikorsky, L.E., Birkenheuer, A.J., Holowaychuk, M.K., McCleary-Wheeler, A.L., Davis, J.M. & Littman, M.P. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), 127-131.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2), 55-59.
- Silva, I.P.C. (2011). *Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil, Setúbal, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006a). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48. Acedido em Out 15, 2013, disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/907/580>.

- Silva, M.S.S. (2008). *Rastreo de parasitas gastrointestinais, pulmonares, cutâneos e musculares em canídeos domésticos e silvestres no Norte de Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Silveira, J., Passos, L., & Ribeiro, M. (2009). Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4), 270–275. Acedido em Jun. 27, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709000806>.
- Simões, P.B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 40:50. Acedido em Jan. 8, 2012., disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082238/>.
- Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C. & Siles-Lucas, M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in Parasitology*, 25(9), 404-409.
- Singh, S.K. Dimri U., Sharma M.C., Swarup, D., Sharma, B., Pandey, H.O. & Kumari, P. (2011). The role of apoptosis in immunosuppression of dogs with demodicosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 487-492.
- Six, R.H., Clemence, R.G., Thomas, C.A., Behan, S., Boy, M.G., Watson, P., Benchaoui, H.A., Clements P.J., Rowan, T.G. & Jernigan, A.D. (2000). Efficacy and safety of selamectin against *Sarcoptes scabiei* on dogs and *Octodectes cynotis* on dogs and cats presented as veterinary patients. *Veterinary Parasitology*, 91(3-4), 291-309.
- Soares, I.R., Silva, S.O., Moreira, F.M., Prado, L.G., Fantini, P., Maranhão, Rde P., da Silva Filho, J.M., Melo, M.N. & Palhares, M.S. (2013). First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4), 665-669.
- Sobrinho, L., Silva, S.O., Moreira, F.M., Prado, L.G., Fantini, P., Maranhão Rde P., da Silva Filho, J.M., Melo M.N. & Palhares, M.S. (2012). Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 187, 302-307.
- Socolovschi, C., Gaudart, J., Bitam, I., Huynh, T.P., Raoult, D. & Parola, P. (2012). Why are there so few *Rickettsia conorii conorii*-infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the wild? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1697. Acedido em Set. 19, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378603/>.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 560-563.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. & The LeishVet Group. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4:86.

- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats--expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48–60.
- Soriano, S.V., Pierangeli, N.B., Roccia, I., Bergagna, H.F., Lazzarini, L.E., Celescinco, A., Saiz, M.S., Kossman, A., Contreras, P.A., Arias, C. & Basualdo, J.A. (2010). A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 167(1), 81-85.
- Sosna, C., & Medleau, L. (1992). Symposium on external parasites. *Veterinary Medicine*, 87:537.
- Sousa, S., Lopes, A.P., Cardoso, L., Silvestre, R., Schallig, H., Reed, S.G. & Cordeiro da Silva, A. (2011). Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica* 120(1-2), 82–87.
- Spolidorio, M.G. Minervino, A.H., Valadas, S.Y., Soares, H.S., Neves, K.A., Labruna, M.B., Ribeiro, M.F. & Gennari, S.M. (2013). Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(2), 214-219.
- Stich, R.W., Schaefer, J.J., Bremer, W.G., Needham, G.R. & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 256–273.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L. & Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(9), 1729-1733.
- Strle, F. (2004). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(37), 27-35.
- Stuen, S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, 31(1), 79–84.
- Sudré, A.P., de Macedo, W., Peralta, R.H.S. & Peralta, J.M. (2006). Diagnóstico de estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Revista de Patologia Tropical*, 35(3), 173-184. Acedido em Nov. 3, 2011, disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/1876/1791>.
- Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J.F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M.N., Fish, D., Telford, S.R., Kantor, F.S. & Fikrig, E. (2006). An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), 1507-1517
- Szwaja, B., Romański, L. & Zabczyk, M. (2011). A case of *Dipylidium caninum* infection in a child from the southeastern Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, 57(3), 175-8. Acedido em Abr. 12, 2013, disponível em: <http://www.esccap.pl/datastore/download/D.caninum-u-dziecka-po-angielsku-2011.pdf>.
- Taboada, J., & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd ed.) (pp. 722-736). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Tangtrongsup, S. & Scorza, V. (2010). Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 155-163.
- Taylor, M.A, Coop, R.L. & Will, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*, (3rd ed). Oxford, UK: Blackwell publishing.

- Theis, J.H. (2005). Public health aspects of dirofilariosis in the United States. *Veterinary Parasitology*, 133(2-3), pp. 157-180. Acedido em: Jan. 5, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705001482>.
- Thiepont, D., Rochette, F. & Van Parijs, O.F.J. (1979). *Diagnosing Helminthiasis Through Coprological Examination*. Belgium: Janssen Research Foundation.
- Tieri, E., Pomilio, F., Di Francesco, G., Saletti, M.A., Totaro, P., Troilo, M., Menna, S., Tampieri, M.P. & Morelli D. (2011). *Angiostrongylus vasorum* in 20 dogs in the Province of Chieti, Italy. *Veterinaria Italiana*, 47(1), 77-88.
- Tomás, A. M., & Romão, S. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose canina* (pp. 7-26). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., Scimeca, S., Turlá, R., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S. & de la Fuente, J. (2007). Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy, during 2003-2005. *Zoonoses and Public Health*, 54(1), 8-15.
- Traversa, D. (2011). Are we playing too much attention to cardiopulmonary nematodes and neglecting old-fashioned worms like *Tricuris vulpis*? *Parasites & Vectors*, 4:32.
- Trotta, M., Nicetto, M., Fogliazza, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(5-6), 294-297.
- Tsai, Y.J., Chung, W.C., Wang, L.C., Ju, Y.T., Hong, C.L., Tsai, Y.Y., Li, Y.H. & Wu, Y.L. (2011). The dog mite, *Demodex canis*: prevalence, fungal co-infection, light, and hair follicle apoptosis. *Journal of Insect Science*, 11:76. Acedido em Mar. 7, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281427/>.
- Tupler, T., Levy, J.K., Sabshin, S.J., Tucker, S.J., Greiner, E.C. & Leutenegger, C.M. (2012). Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(3), 338-43.
- Ugbomoiko, U.S., Ariza, L. & Heukelbach, J. (2008). Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limited knowledge of pet owners. *BMC Veterinary Research*, 4:49. Acedido em Nov. 11, 2013, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/49>.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology* 138(1-2), 3–10.
- ul-Hasan, M., Abubakar, M., Muhammad, G., Khan, M.N. & Hussain, M. (2012). Prevalence of tick infestation (*Rhipicephalus sanguineus* and *Hyalomma anatolicum anatolicum*) in dogs in Punjab, Pakistan. *Veterinaria Italiana*, 48(1), 95-98.
- Urquhart, G.M., Armor, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology* (2<sup>nd</sup> ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Vial, H.J. & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 147–160. Acedido em Set. 21, 2011, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000677>.
- Villaescusa, A., Tesouro, M.A., García-Sancho, M., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2012). Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-owned dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(4), 391-396.



- Vlkova, M., Rohousova, I., Drahota, J., Stanneck, D., Kruehwagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D. & Volf, P. (2011). Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), e1344.
- Volgina, N., Romashov, B.V., Romashova, N.B. & Shtannikov, A.V. (2013). Prevalence of borreliosis, anaplasmosis, ehrlichiosis and *Dirofilaria immitis* in dogs and vectors in Voronezh Reserve (Russia). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(6), pp. 567–574.
- Wallménius, K., Pettersson, J.H., Jaenson, T.G. & Nilsson, K. (2012). Prevalence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in adult ricinus ticks from 29 study areas in Central and Southern Sweden. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(2), 100-106.
- Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y. & Keysary, A. (1997). Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69(3-4), 307-317.
- Wang, L.-C. (1997). Canine filarial infections in North Taiwan. *Acta Tropica*, 68(1), pp. 115–120.
- Wells, K., Beaucournu, J.C., Durden, L.A., Petney, T.N., Lakim, M.B. & O'Hara, R.B. (2012). Ectoparasite infestation patterns of domestic dogs in suburban and rural areas in Borneo. *Parasitology Research*, 111(2), 909-919.
- White, S., Rosychuk, R., & Fieseler, K. (2001). Clinicopathologic findings, sensitivity to house dust mites and efficacy of milbemycin oxime treatment of dogs with *Cheyletiella* sp. infestation. *Veterinary Dermatology*, 12(1), 13-18.
- Willesen, J., Kristensen, A.T., Jensen, A.L., Heine, J. & Koch, J. (2007). Efficacy and safety of imidacloprid/moxidectin spot-on solution and fenbendazole in the treatment of dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Veterinary Parasitology*, 147(3-4), 258–264.
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), pp. 108–122.
- Wolfe, A., & Wright, I. (2003). Human toxocariasis and direct contact with dogs. *The Veterinary Record*, 152(14), 419-422.
- Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Visser, M., Knaus, M., Lindner, T. & Rehbein, S. (2009). Ectoparasites of dogs and cats in Albania. *Parasitology Research*, 105(6), 1577-1587.
- Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Kondi, E., Postoli, R., Rinaldi, L., Dimitrova, Z.M., Visser, M., Knaus, M. & Rehbein, S. (2011). Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitology Research*, 108(2), 341–353.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. & Upton, S.J. (17 de Jan de 2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72-97.
- Yang, M., Gebeyehu, E.B., Jung, S.J., Kwon, O.D. & Kwak, D. (2013). Treatment of naturally acquired *Strongyloides stercoralis* infection in a dog with ivermectin. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(1), 337-339. Acedido em Jan. 3, 2014, disponível em: <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-23-1/52.pdf>.

- Yuasa, Y., Hsu, T.H., Chou, C.C., Huang, C.C., Huang, W.C. & Chang, C.C. (2012). The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(6), 599–606.
- Zandvliet, M.M., Teske, E. & Piek, C.J. (2004). *Ehrlichia* and *Babesia* infections in dogs in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskde*, 129(22), 740-745.
- Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R., Tarducci, A. & Guarraci, A. (2003). Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research*, 64(5), 558-561.
- Zhu, Y., Fournier, P.E., Ereemeeva, M. & Raoult, D. (2005). Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BioMed Central Microbiology*, 14, 5:11. Acedido em Fev. 22, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1079849/>.
- Zygner, W., Gójska-Zygner, O., Wesółowska, A. & Wędrychowicz, H. (2013). Urinary creatinine to serum creatinine ratio and renal failure index in dogs infected with *Babesia canis*. *Acta Parasitologica, Witold Stefński Institute of Parasitology, Warszawa, Poland*, 58(3), 297-303.

## ANEXOS

### Anexo I: Técnica de imunofluorescência indirecta

1. Retiraram-se os soros do congelador e deixaram-se à temperatura ambiente, até à sua descongelação;
2. Retiraram-se as lâminas de antigénio dos *kits* mencionados na tabela 31, do frigorífico, colocando-as à temperatura ambiente, durante 15 minutos;
3. Procedeu-se à preparação do PBS, diluindo-se um frasco de PBS (BioMérieux® França, Ref. 75 931) num litro de água destilada;
4. Procedeu-se à preparação do PBS-*Tween* 80, efectuando o procedimento descrito em 3) e posteriormente juntando 1 mililitro de *Tween* 80 (Merck® Alemanha, Ref. 822 187) ao litro de PBS, já previamente preparado;
5. Identificou-se uma microplaca, com a numeração dos respectivos poços, de acordo com a identificação dos soros;
6. Colocou-se, na 1ª coluna da microplaca, por meio de uma micropipeta, a quantidade de PBS requerida pelo teste, conforme tabela 31, de forma a conceder as diluições necessárias, de acordo com o cutt-off (limiar de positividade) de cada teste; No caso do teste Leishmania Spot IFI, colocaram-se 50 µl de PBS nos poços da 2ª coluna da microplaca.
7. De seguida colocou-se a quantidade necessária de soro nos poços da microplaca, conforme tabela 31, retirando-o dos *eppendorf's*, com uma micropipeta, após uma prévia agitação, com o auxílio de um agitador;
8. Apenas no teste Leishmania Spot IFI, retiraram-se 50 µl de cada poço da 1ª coluna da microplaca e colocaram-se nos correspondentes poços da 2ª coluna desta e, agitou-se, com o auxílio da micropipeta.
9. Retiraram-se 10 µl de cada soro diluído da 1ª coluna da microplaca (no caso dos testes de pesquisa de hemoparasitas) e da 2ª coluna da microplaca (no caso do teste Leishmania Spot IFI), após prévia homogenização e, colocaram-se nos poços da lâmina correspondentes aos testes
10. Depositaram-se os controlos, positivo e negativo, nos respectivos poços;
11. Procedeu-se à incubação em câmara húmida, à temperatura de 37°C, durante 30 minutos;
12. Após, procedeu-se à lavagem das lâminas, efectuando-se quatro lavagens (figura 18), do seguinte modo:
  - a) 1ª lavagem de 1 a 3 segundos com PBS/*Tween* 80
  - b) 2ª lavagem de 5 minutos, mergulhando as lâminas num recipiente com PBS/*Tween* 80;
  - c) 3ª lavagem de 5 minutos, igual à 2ª lavagem mas noutra recipiente;
  - d) 4ª lavagem de 5 a 10 segundos, com água destilada;
13. Secaram-se as lâminas, com o auxílio de um secador;
14. Colocou-se uma gota do conjugado do *Kit* respetivo, em cada poço;
15. Repetiram-se os pontos 11, 12 e 13;
16. Após colocou-se uma gota do meio de montagem fornecido com os *kits* e cobriu-se com uma lamela de 50X24 mm;

17. Procedeu-se à observação das lâminas no microscópio de fluorescência (marca Olympus DP10, modelo BX50F), com radiação de comprimento de onda de 425nm

Tabela 33: Quantidade (µl) de amostra e PBS necessárias para as diluições na técnica de imunofluorescência indirecta, consoante os kit utilizados na pesquisa dos vários agentes etiológicos e os limiares de positividade.

Kit laboratorial	Limiar de positividade	Quantidade de amostra (µl)	Quantidade de PBS (µl)
<b>Leishmania Spot IFI</b>	1:80	5	395
<b>MegaScreen FLUOBABESIA canis</b>	1:32	5	155
<b>MegaScreen FLUOANAPLASMA phagocytophilum</b>	1:50	5	245
<b>MegaScreen FLUOEHRlichia canis</b>	1:40	5	195
<b>MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii</b>	1:64	5	315

Figura 18: A) *Eppendorf's* com soro e microplaca com PBS e amostras diluídas; B) estufa onde foram colocadas as lâminas à temperatura de 37°C; C) Lavagem das lâminas (passo 12b) (originais).



## **Anexo II: Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, em esfregaço fecal**

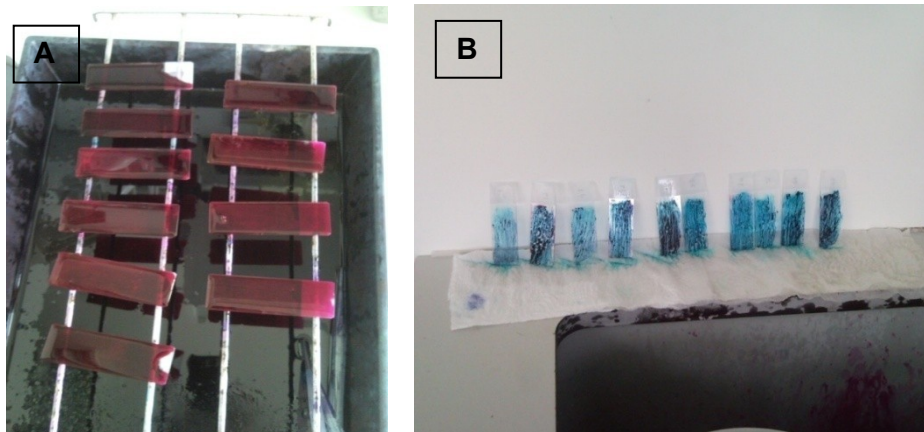
### **I – Esfregaço fecal**

Homogeneizou-se as fezes contidas no frasco, e retirou-se, com o auxílio de uma vareta, uma pequena amostra, distribuindo-a ao longo de uma lâmina de vidro. Deixou-se secar.

### **II – Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada**

- 1 – Colocou-se metanol sobre as lâminas durante 1 minuto (fixação);
- 2 – Sem retirar o metanol, cobriu-se a lâmina com fucsina básica fenicada (Panreac®) durante 10 minutos (figura 19);
- 3 – Procedeu-se a lavagem com água;
- 4 – Colocou-se álcool clorídrico a 1% para retirar o corante em excesso;
- 5 – Procedeu-se a lavagem com água;
- 6 – Colocou-se Verde Malaquite 0,4% (Merck ®) durante 30 segundos;
- 7 – Lavou-se com água e deixou-se as lâminas a secar;

Figura 19: A) passo II-2 da técnica de Ziehl-Neelsen modificada; B) Secagem das lâminas após a coloração pela técnica Ziehl-Neelsen modificada (passo II-7) (originais).



### Anexo III: Amostra populacional

Tabela 3: Características dos animais capturados (amostra populacional)

Identificação (ID)	Data de Entrada	Proveniência Freguesia	Raça	Idade	Sexo	Esterilização	Gestante/Lactante	Cor	Tipo de pelagem	Porte
1	14-10-2011	Vialonga	Indeterminada	8 a	♂	N	NA	Castanha	C/L	M
2	09-11-2011	Alhandra	Indeterminada	2 a	♂	N	NA	Preta	C/L	P
3	15-11-2011	Cachoeiras	Indeterminada	3 a	♂	N	NA	Castanha	C/L	G
4	05-12-2011	Sobralinho	Indeterminada	2 a	♀	N	N	Branca e preta	C/L	M
5	07-12-2011	Sobralinho	Pastor Alemão	12 a	♂	N	NA	Preta e amarela	M/L	G
6	05-12-2011	Vila Franca Xira	X Boxer	8 a	♂	N	NA	Castanha e branca	C/L	G
7	09-12-2011	Alverca do Ribatejo	X Podengo	2 a	♀	N	N	Branca	C/L	M
8	14-10-2011	Vialonga	Indeterminada	1 a	♂	N	NA	Amarela cinza	C/L	G
9	12-12-2011	Castanheira Ribatejo	X Caniche	6 a	♂	N	NA	Preta	Co/E	P
10	19-12-2011	Castanheira Ribatejo	Boxer	7 a	♀	N	N	Castanha	C/L	M
11	18-11-2011	Castanheira Ribatejo	Podengo	2 a	♂	N	NA	Castanha clara	C/L	M
12	20-12-2011	Vila Franca Xira	Indeterminada	6 a	♂	N	NA	Tricolor	C/L	M
13	05-01-2012	S. João dos Montes	Indeterminada	5 a	♂	N	NA	Preta e amarela	Co/O	M
14	19-01-2012	Castanheira Ribatejo	Serra da Estrela	9 a	♂	N	NA	Fulva	Co/O	G
15	01-02-2012	Calhandriz	Indeterminada	8 a	♂	N	NA	Amarela cinza	M/Ce	M
16	23-01-2012	Vila Franca de Xira	Caniche	11 a	♂	N	NA	Branca	Co/E	P
17	26-01-2012	S. João dos Montes	Indeterminada	9 a	♂	N	NA	Castanha e branca	C/L	P
18	30-01-2012	Alverca do Ribatejo	Indeterminada	6 a	♂	N	NA	Tigrada	C/L	M
19	12-09-2012	Póvoa Santa Iria	Indeterminada	6 a	♂	N	NA	Amarela	M/L	G
20	31-01-2012	Sobralinho	Indeterminada	3 m	♀	N	N	Preta	M/O	M

**Legenda:** ♂ - masculino      Co – comprida      M – médio      X – cruzamento  
 ♀ - feminino      E – encaracolada      N – não  
 a – anos      G – grande      NA – não admitido  
 AST - American Staffordshire Terrier      L – liso      O – ondulado  
 C – curta      Lac - lactante      P – pequeno  
 Ce – cerdosa      m – meses      S – sim

Tabela 3 – Características dos animais capturados (amostra populacional) (continuação).

Identificação (ID)	Data de Entrada	Proveniência Freguesia	Raça	Idade	Sexo	Esterilização	Gestante/Lactante	Cor	Tipo de pelagem	Porte
21	12-09-2012	Alhandra	Podengo	2 a	♂	N	NA	Castanha malhada	M/Ce	M
22	31-01-2012	Sobralinho	Indeterminada	4 m	♀	N	N	Preta e castanha	C/L	G
23	31-01-2012	Sobralinho	Indeterminada	4 m	♀	N	N	Preta e amarela	M/L	G
24	31-01-2012	Sobralinho	Serra da Estrela	6 m	♀	N	N	Fulva	Co/O	G
25	08-11-2011	S. João dos Montes	Podengo	2 a	♀	N	S	Castanha	C/L	M
26	27-09-2012	Forte da Casa	Husky Siberiano	9 a	♂	N	NA	Branca e cinza	M/L	G
27	31-01-2012	Sobralinho	X Podengo	2 a	♂	N	NA	Cinza e amarela	M/O	G
28	31-01-2012	Sobralinho	Indeterminada	5 m	♂	N	NA	Preta	C/L	G
29	31-01-2012	Sobralinho	Indeterminado	5 a	♀	N	N	Tigrada	C/L	M
30	02-02-2012	Castanheira Ribatejo	X Pit Bull	8 m	♂	N	NA	Preta e branca	C/L	G
31	03-02-2012	Vila Franca de Xira	Braco Alemão	3 a	♂	N	NA	Preta malhada	C/L	M
32	02-09-2012	Vialonga	Husky Siberiano	11 a	♂	N	NA	Branca e cinza	M/L	G
33	31-07-2012	S. João dos Montes	E. Breton	6 a	♂	N	NA	Laranja e branca	M/O	M
34	08-02-2012	Vialonga	Indeterminada	2 a	♀	N	S	Castanha clara	C/L	M
35	27-12-2011	S. João dos Montes	Indeterminada	4 a	♂	N	NA	Amarela mosqueada	C/L	M
36	22-02-2012	Castanheira Ribatejo	E. Breton	2 a	♂	N	NA	Laranja e branca	M/O	M
37	01-03-2012	Vila Franca de Xira	Caniche	14 a	♀	N	N	Cinza	Co/E	P
38	03-03-2012	Castanheira Ribatejo	Indeterminada	6 m	♀	N	N	Castanha	C/L	M
39	03-03-2012	Vialonga	Pit Bull	4 a	♀	N	N	Castanha clara	C/L	G
40	22-03-2012	Vila Franca de Xira	X Cocker Spaniel	6 a	♀	N	N	Preta	Co/O	M

**Legenda:** ♂ - masculino

♀ - feminino

a – anos

AST - American Staffordshire Terrier

C – curta

Ce – cerdosa

Co – comprida

E – encaracolada

G – grande

L – liso

Lac - lactante

m – meses

M – médio

N – não

NA – não admitido

O – ondulado

P – pequeno

S – sim

X – cruzamento

Tabela 3 – Características dos animais capturados (amostra populacional) (continuação).

Identificação (ID)	Data de Entrada	Proveniência Freguesia	Raça	Idade	Sexo	Esterilização	Gestante/Lactante	Cor	Tipo de pelagem	Porte
41	16-03-2012	Alverca do Ribatejo	A. Staff. Terrier	2 a	♂	N	NA	Branca e amarela	C/L	G
42	04-03-2012	Castanheira Ribatejo	Indeterminada	6 m	♀	N	N	Castanha e branca	C/L	M
43	08-03-2012	Alverca do Ribatejo	Indeterminada	2 a	♂	N	NA	Castanha clara	M/O	P
44	26-03-2012	Alhandra	Indeterminada	3 a	♂	N	NA	Castanha	M/O	P
45	02-04-2012	Castanheira Ribatejo	Indeterminada	2 a	♂	N	NA	Lobeira	C/L	G
46	04-04-2012	Vila Franca de Xira	X Podengo	1 a	♂	N	NA	Amarela	C/L	P
47	04-04-2012	Castanheira Ribatejo	Caniche	14 a	♀	N	N	Branca malhada	Co/E	P
48	09-04-2012	Castanheira Ribatejo	Indeterminada	1 a	♂	N	NA	Amarela mosqueada	C/L	M
49	27-02-2012	Calhandriz	X Podengo	5 a	♀	N	S	Castanha	M/O	M
50	18-04-2012	Sobralinho	X Podengo	6 m	♀	N	N	Castanha cinza	M/Ce	P
51	18-04-2012	Sobralinho	Indeterminada	12 a	♂	N	NA	Branca	C/L	M
52	18-04-2012	Sobralinho	Indeterminada	2 a	♀	N	N	Preta	M/O	M
53	23-04-2012	S. João dos Montes	Indeterminada	1 a	♀	N	Lac	Castanha clara	C/L	M
54	15-04-2012	Vialonga	X Pit Bull	1 a	♀	N	N	Branca malhada	C/L	G
55	27-04-2012	Castanheira Ribatejo	Pastor Belga	2 a	♀	N	N	Preta	Co/L	G
56	30-04-2012	Castanheira Ribatejo	X Pointer	1 a	♂	N	NA	Preta mosqueada	C/L	M
57	03-05-2012	Póvoa de Santa Iria	Pit Bull	6 a	♂	N	NA	Branca malhada	C/L	G
58	20-04-2012	Alverca do Ribatejo	Pit Bull	3 a	♂	N	NA	Amarela e cinza	C/L	G
59	04-05-2012	Castanheira Ribatejo	X Pequinois	8 a	♀	N	N	Cinzenta	M/O	P
60	28-05-2012	Vila Franca de Xira	Pastor Alemão	9 a	♀	N	N	Preta e amarela	M/L	G

**Legenda:** ♂ - masculino

♀ - feminino

a – anos

AST - American Staffordshire Terrier

C – curta

Ce – cerdosa

Co – comprida

E – encaracolada

G – grande

L – liso

Lac - lactante

m – meses

M – médio

N – não

NA – não admitido

O – ondulado

P – pequeno

S – sim

X – cruzamento



Tabela 3 – Características dos animais capturados (amostra populacional).

Identificação (ID)	Data de Entrada	Proveniência Freguesia	Raça	Idade	Sexo	Esterilização	Gestante/Lactante	Cor	Tipo de pelagem	Porte
61	20-08-2012	Forte da Casa	Boxer	13 a	♂	N	NA	Castanha	C/L	G
62	16-05-2012	Vialonga	Pit Bull	2 a	♂	N	NA	Tigrada	C/L	G
63	28-06-2012	Alhandra	Indeterminada	10 a	♂	N	NA	Preta e castanha	C/L	M
64	28-06-2012	Castanheira Ribatejo	Indeterminada	11 a	♀	N	N	Castanha e preta	C/L	G
65	12-07-2012	Vialonga	A. Staff. Terrier	9 a	♂	N	NA	Amarela e branca	C/L	G
66	16-07-2012	Alverca do Ribatejo	Serra d' Aires	1 a	♀	N	N	Preta e castanha	M/Ce	P
67	17-07-2012	Castanheira Ribatejo	X Rotweiller	7 a	♀	N	N	Preta afogueada	C/L	G
68	25-07-2012	S. João dos Montes	Indeterminada	8 a	♂	N	NA	Castanha	C/L	G
69	13-08-2012	Castanheira Ribatejo	X Serra da Estrela	6 a	♀	N	S	Lobeira	Co/L	G
70	08-08-2012	Calhandriz	Indeterminada	2 a	♀	N	Lac	Preta	C/L	M
71	24-08-2012	Vialonga	Indeterminada	6 m	♂	N	NA	Castanha	C/L	M
72	28-08-2012	Alverca do Ribatejo	Indeterminada	8 m	♂	N	NA	Castanha	C/L	M
73	29-08-2012	Vialonga	Indeterminada	2 a	♂	N	NA	Preta	C/L	M
74	06-09-2012	S. João dos Montes	X Podengo	11 a	♂	N	NA	Castanha	M/Ce	M
75	11-09-2012	Vila Franca de Xira	Husky Siberiano	9 a	♀	N	N	Cinza e branca	Co/L	G
76	10-09-2012	Castanheira Ribatejo	Podengo	3 a	♂	N	NA	Castanha	M/Ce	M
77	13-09-2012	Alverca do Ribatejo	Indeterminada	4 a	♀	N	N	Creme	C/L	M
78	18-09-2012	Cachoeiras	Indeterminada	2 a	♀	N	Lac	Amarela	C/L	M
79	20-09-2012	Vialonga	Caniche	8 a	♂	N	NA	Branca	Co/E	P
80	26-09-2012	Cachoeiras	Indeterminada	1 a	♀	N	N	Preta e amarela	C/L	G

**Legenda:** ♂ - masculino

♀ - feminino

a – anos

AST - American Staffordshire Terrier

C – curta

Ce – cerdosa

Co – comprida

E – encaracolada

G – grande

L – liso

Lac - lactante

m – meses

M – médio

N – não

NA – não admitido

O – ondulado

P – pequeno

S – sim

X – cruzamento

### Anexo III: Exame de Estado Geral

Tabela 10: Sinais observados durante o exame de estado geral dos animais da amostra.

Animal	Exame de estado geral
1	Úlceras muco-cutâneas no focinho, olhos, orelhas, nariz e membros; onicogribose nos quatro membros; descamação; hiperqueratose; aumento dos linfonodos
2	Bom estado geral
3	Dor articular carpo-metacárpica do membro anterior esquerdo
4	Magreza; diarreia
5	Magreza acentuada; dificuldade de locomoção; dor nos membros posteriores; mucosas pálidas
6	Magreza acentuada; lesão circular com 3 cm diâmetro no dorso; debilidade muscular
7	Caquexia; lesões pruriginosas nos membros e abdômen com zonas de alopecia
8	Bom estado geral
9	Descoordenação motora; segmentos de parasitas (céstodes) nas fezes
10	Onicogribose; nódulo móvel subcutâneo com 6 cm de diâmetro na coxa esquerda
11	Diarreia
12	Bom estado geral
13	Bom estado geral
14	Bom estado geral
15	Magreza
16	Epistáxis; corrimento ocular bilateral; onicogribose; poliúria e polidipsia
17	Foi agredido; corte cutâneo de 20 cm no abdômen esquerdo com bordos necrosados; corte de 5 cm na coxa direita e outro de 2 cm na coxa esquerda; presença de ectoparasitas (pulgas); parasita adulto do tipo teniforme nas fezes
18	Alopecia e descamação na orelha direita; caquexia; aumento dos linfonodos
19	Lesões muco-cutâneas no nariz; epistáxis; caquexia; alopecia e queratinização nos cotovelos, orelhas, olhos e membros; debilidade muscular; dor articular
20	Bom estado geral
21	Ferida longitudinal com 4 cm no focinho
22	Prostração; diarreia; parasitas adultos (nemátodes) nas fezes
23	Bom estado geral
24	Bom estado geral
25	Alopecia generalizada; lesões pruriginosas; em lactação; cachorros apresentam pápulas e prurido
26	Magreza acentuada; doença periodontal
27	Bom estado geral
28	Diarreia
29	Caquexia; debilidade muscular; aumento dos linfonodos
30	Bom estado geral
31	Bom estado geral
32	Caquexia; prostração
33	Lesões ulcerativas muco-cutâneas em redor dos olhos, nariz e cotovelos; onicogribose; hiperqueratose
34	Bom estado geral; gestação
35	Magreza; dor no membro posterior esquerdo
36	Apatia
37	Onicogribose; nódulo intramuscular de 2 cm de diâmetro no membro posterior esquerdo; corrimento ocular bilateral; respiração ruidosa; sopro cardíaco
38	Bom estado geral
39	Presença de ectoparasitas (ixodídeos)
40	Lesões ulcerativas muco-cutâneas com hiperqueratinização e sangramento nas orelhas, focinho e em redor dos olhos; descamação; e hiperqueratose

Tabela 10: Sinais observados durante o exame de estado geral dos animais da amostra (continuação)

<b>Animal</b>	<b>Exame de estado geral</b>
<b>41</b>	Presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>42</b>	Presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>43</b>	Bom estado geral
<b>44</b>	Vítima de atropelamento; corte no membro esquerdo e na cabeça
<b>45</b>	Presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>46</b>	Bom estado geral
<b>47</b>	Sem reflexo pupilar bilateral
<b>48</b>	Várias zonas de alopecia; descamação e hiperqueratose nas orelhas, membros, focinho e olhos
<b>49</b>	Gestação; presença de parasitas adultos (nemátodes) nas fezes
<b>50</b>	Presença de muitos ectoparasitas (ixodídeos)
<b>51</b>	Doença periodontal; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>52</b>	Diarreia
<b>53</b>	Lactante; presença de ectoparasitas (ixodídeos); segmentos de parasitas (céstodes) nas fezes
<b>54</b>	Bom estado geral
<b>55</b>	Diarreia; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>56</b>	Presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>57</b>	Onicogribose; lesões ulcerativas muco-cutâneas no focinho e membros ; alopecia bi-ocular; descamação; hiperqueratose; magreza; aumento dos linfonodos
<b>58</b>	Nódulos intra-dérmicos; presença de ectoparasitas (ixodídeos e pulgas)
<b>59</b>	Alopecia generalizada com descamação; magreza acentuada; hiperqueratose; presença de ectoparasitas (pulgas)
<b>60</b>	Caquexia; onicogribose; dor articular; debilidade muscular; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>61</b>	Magreza acentuada; descamação no focinho e orelhas
<b>62</b>	Presença de ectoparasitas (pulgas)
<b>63</b>	Descamação e alopecia na extremidade das orelhas; nódulo móvel e pouco consistente de 5 cm de diâmetro no membro anterior direito
<b>64</b>	Dermatite com alopecia no dorso e face lateral da coxa direita; presença de ectoparasitas (pulgas)
<b>65</b>	Dermatite generalizada com zonas de alopecia e descamação; nódulos intradérmicos; hiperqueratose
<b>66</b>	Paralisia dos membros posteriores por possível traumatismo; presença de muitos ectoparasitas (ixodídeos)
<b>67</b>	Caquexia; aumento dos linfonodos; massa necrosada com 8 cm de diâmetro na zona distal do membro anterior direito
<b>68</b>	Caquexia; onicogribose; lesões cutâneas com hiperqueratose nos cotovelos; debilidade muscular
<b>69</b>	Gestação; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>70</b>	Lactante; magreza
<b>71</b>	Alopecia generalizada; descamação; eritema; prurido; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>72</b>	Alopecia generalizada; descamação; eritema; prurido; hiperpigmentação da pele
<b>73</b>	Bom estado geral
<b>74</b>	Alopecia no dorso; prurido; presença de ectoparasitas (pulgas); onicogribose
<b>75</b>	Atrofia muscular (coxa); dor na articulação coxo-femoral; presença de ectoparasitas (ixodídeos)
<b>76</b>	Bom estado geral
<b>77</b>	Alopecia no pescoço, peito, membros, abdómen, virilhas, focinho e peri-ocular; prurido; hiperqueratose
<b>78</b>	Lactante
<b>79</b>	Piodermatite na cabeça e tronco; alopecia peri-ocular; nódulos intradérmicos; descamação
<b>80</b>	Bom estado geral

# Anexo V: Resultados

Tabela 11: Resultados obtidos pelas técnicas/metodologias efectuadas na amostra populacional (n=80).

ID	Kit -SD	Knott	Willis	Baermann	Ziehl-Neelsen	IFI Li 1:80	IFI Ap 1:50	IFI Bc 1:32	IFI Ec 1:40	IFI Rc 1:64	E.S. (Giemsa)	Ect.	Outros
01	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	+	+	+	⊖	hemolisado	⊖	--
02	⊖	⊖	Ac; Tv	⊖	Gs	+	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
03	⊖	⊖	⊖	⊖	Cr; Gs	⊖	+	+	+	+	⊖	⊖	--
04	⊖	⊖	Tc; Us	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	T. canis**
05	⊖	⊖	⊖	⊖	Cr	⊖	+	+	+	+	⊖	⊖	Dc (proglotes)**
06	⊖	Ar	Us	⊖	Gs	⊖	+	+	+	+	⊖	⊖	--
07	⊖	Ar	⊖	⊖	Gs	⊖	+	+	+	+	⊖	S.scabiei	--
08	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
09	⊖	Ar	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	+	+	⊖	⊖	Dc (proglotes)**
10	⊖	⊖	⊖	⊖	Cr	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	⊖	--
11	⊖	⊖	Ac; Tv	⊖	Gs	⊖	⊖	+	+	+	⊖	⊖	--
12	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
13	⊖	⊖	Ac	⊖	Gs	+	+	⊖	+	+	⊖	⊖	--
14	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	⊖	--
15	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
16	+	Di	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	Kit – Leish K ⊖
17	⊖	⊖	Ts	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	+	⊖	C.felis	--
18	+	Di	Ac	⊖	⊖	+	+	+	+	+	⊖	S.scabiei	--
19	+	Di	⊖	⊖	Gs	+	⊖	+	⊖	+	↑↑ eos	⊖	Kit – Leish K +
20	⊖	⊖	Us	⊖	Gs	⊖	+	+	⊖	⊖	⊖	⊖	--
21	⊖	Ar	Tc; Ss	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	+	⊖	⊖	T.canis (ovos) *
22	⊖	⊖	Tc	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	⊖	Kit – CPV/CCV +
23	⊖	⊖	Tv	⊖	Gs	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
24	⊖	Ar	Tv	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
25	⊖	⊖	Tv	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	S.scabiei	--
26	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
27	⊖	⊖	Ac	⊖	Cr	⊖	+	+	+	+	⊖	⊖	--
28	⊖	⊖	Ac	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	⊖	--
29	⊖	Ar	Ts	⊖	⊖	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
30	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	hemolisado	⊖	--
31	⊖	⊖	Tv; Tc	⊖	⊖	⊖	+	+	⊖	+	⊖	⊖	--
32	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--

Tabela 11: Resultados obtidos pelas técnicas/metodologias efectuadas na amostra populacional (n=80) (continuação).

ID	Kit -SD	Knott	Willis	Baerman	Ziehl-Neelsen	IFI <i>Li</i> 1:80	IFI <i>Ap</i> 1:50	IFI <i>Bc</i> 1:32	IFI <i>Ec</i> 1:40	IFI <i>Rc</i> 1:64	E.S. (Giemsa)	Ect.	Outros
33	⊖	⊖	⊖	⊖	Gs	+	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>Rh.s</i>	Kit – Leish K ⊖
34	⊖	⊖	<i>Tv</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
35	⊖	⊖	<i>Ss</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	⊖	+	+	⊖	⊖	--
36	+	<i>Di</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
37	⊖	⊖	<i>Us</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>C.felis</i>	--
38	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	--
39	⊖	⊖	<i>Ac</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	<i>Rh.s</i>	--
40	⊖	⊖	<i>Ss</i>	⊖	⊖	+	+	+	+	+	hemolisado	<i>Rh.s</i>	--
41	⊖	⊖	<i>Us; Tc</i>	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	<i>Rh.s</i>	--
42	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	<i>Rh.s</i>	--
43	⊖	⊖	<i>Ts</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
44	⊖	⊖	<i>Ts</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	--
45	+	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	+	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
46	⊖	⊖	<i>Tv</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
47	⊖	⊖	⊖	⊖	Gs	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
48	⊖	⊖	<i>Ac</i>	⊖	Gs	+	⊖	+	+	+	⊖	⊖	--
49	⊖	⊖	<i>Tc</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	--
50	⊖	⊖	⊖	⊖	<i>Cr</i>	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
51	⊖	⊖	<i>Tc</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
52	⊖	⊖	<i>Ac</i>	⊖	<i>Cr; Gs</i>	⊖	⊖	⊖	⊖	+	↑↑ eos	⊖	--
53	⊖	⊖	<i>Ts</i>	⊖	Gs	⊖	+	+	+	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
54	⊖	⊖	<i>Us</i>	⊖	<i>Cr</i>	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	⊖	--
55	⊖	⊖	<i>Tc</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
56	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	<i>Rh.s</i>	--
57	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
58	+	⊖	<i>Tc</i>	⊖	Gs	+	⊖	⊖	⊖	+	⊖	<i>Rh.s; C.felis</i>	--
59	⊖	⊖	<i>Ss; Ts</i>	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>C.felis</i>	<i>Taenia</i> spp. **
60	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	+	+	+	+	⊖	<i>Rh.s</i>	--
61	⊖	<i>Ar</i>	<i>Ac</i>	⊖	Gs	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	--
62	⊖	⊖	<i>Tc</i>	⊖	Gs	⊖	⊖	+	+	+	⊖	<i>C.felis</i>	--
63	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	+	+	⊖	⊖	--
64	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	⊖	<i>C.felis</i>	--
65	⊖	⊖	<i>Us</i>	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	<i>Dc</i> (proglotes)**

Tabela 11: Resultados obtidos pelas técnicas/metodologias efectuadas na amostra populacional (n=80) (continuação).

ID	Kit -SD	Knott	Willis	Baerman	Ziehl-Neelsen	IFI <i>Li</i> 1:80	IFI <i>Ap</i> 1:50	IFI <i>Bc</i> 1:32	IFI <i>Ec</i> 1:40	IFI <i>Rc</i> 1:64	E.S. (Giemsa)	Ect.	Outros
66	+	-	Ac; Us	-	-	+	-	-	-	+	-	<i>Rh.s</i>	--
67	+	Di	Tc	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Rh.s</i> ; <i>C.felis</i>	--
68	-	-	Us; Ts	-	Gs	+	-	-	-	+	-	-	--
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Rh.s</i>	--
70	-	-	Us; Tc	-	-	-	+	+	-	-	↑↑ eos	-	--
71	-	-	Us	-	Gs	-	+	+	+	+	-	<i>S.scabiei</i> ; <i>Rh.s</i>	--
72	-	-	Ac;Us; Ts	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>D.canis</i> ; <i>S.scabiei</i>	--
73	+	Ar; Di	Us	-	-	-	-	+	+	+	mi	-	--
74	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	<i>C.felis</i>	Kit – Leish K -
75	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	<i>Rh.s</i>	--
76	-	-	-	-	Cr; Gs	-	-	+	-	-	-	-	--
77	+	Di	Ss	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>D.canis</i>	--
78	-	-	-	-	Cr	-	-	+	+	+	-	-	--
79	-	Ar	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Kit – DFV L -
80	+	Di	Ss; Tv	-	-	-	+	-	+	+	-	-	--

**Legenda:**

+	- Positivo	Ect.	- Ectoparasitas	Ss	- <i>Strongyloides stercoralis</i>
+	- Positivo fraco	E.S.	- Esfregaço de sangue	<i>S.scabiei</i>	- <i>Sarcoptes scabiei</i>
-	- Negativo	Gs	- <i>Giardia spp.</i>	Tc	- <i>Toxocara canis</i>
Ac	- <i>Ancylostoma caninum</i>	IFI	- Imunofluorescência indirecta	Ts	- <i>Taenia spp.</i>
Ap	- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Kit – CPV/CCV	- Kit rápido Parvo/Corona	Tv	- <i>Trichuris vulpis</i>
Ar	- <i>Achantocheilonema reconditum</i>	Kit – DFV L	- Kit rápido DFV Leishmania	Us	- <i>Uncinaria stenocephala</i>
Bc	- <i>Babesia canis</i>	Kit – Leish K	- Kit rápido speed Leish K	↑↑ eos	- Muitos eosinófilos
<i>C.felis</i>	- <i>Cnetacephalides felis</i>	Kit-SD	- Kit Speed Diro	*	- em raspagem cutânea
Cs	- <i>Cryptosporidium spp.</i>	Li	- <i>Leishmania infantum</i>	**	- exame visual das fezes
Dc	- <i>Dipylidium caninum</i>	mi	- microfilária		
<i>D.canis</i>	- <i>Demodex canis</i>	Rc	- <i>Rickettsia conorii</i>		
Di	- <i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Rh.s</i>	- <i>Rhipicephalus sanguineus</i>		

# Anexo VI: Estudos de seroprevalências de hemoparasitas realizados por outros autores

Tabela 34: Prevalências de hemoparasitas em cães por estudos realizados por outros autores em diferentes países/locais.

Autor	Miró <i>et al.</i> , 2013	Paulan <i>et al.</i> , 2013	Spolidorio <i>et al.</i> , 2013	Volgina <i>et al.</i> , 2013	Cardoso <i>et al.</i> , 2012	Caeiros, 2012
Local	Espanha	Brasil, São Paulo, Ilha Solteira	Brasil, Amazônia	Rússia, Voronezh	Portugal	Portugal, Distrito de Lisboa
Método	ELISA (4DXSnap® Test)	IFI	IFI	ELISA (4DXSnap® Test)	ELISA (4DXSnap® Test)	IFI PCR Esfregaço sanguíneo
População	Cães com proprietário	Cães com proprietário	Cães errantes e com proprietário	Cães com proprietário	Cães saudáveis e suspeitos (CAMV)	Cães de canil e de CAMV
Nº amostra	1100	93	129	82	557+628	80
Prevalência global	—	—	—	—	—	—
<i>B. canis</i>	—	72% (1:40)	<i>B. canis vogeli</i> 42,6% (1:64)	—	—	IFI - 17,5% (1:32) qPCR – 42,5%
<i>A. phagocytophilum</i>	3,1%	—	—	34,1%	Saudáveis: 4,5% Suspeitos: 9,2%	IFI - 18,7% (1:50) <i>E. canis/A phagocytophilum</i> qPCR – 20%
<i>E. canis</i>	5%	<i>Ehrlichia</i> spp. 75,3% (1:40)	16,2% (1:80)	2,3%	Saudáveis: 4,1% Suspeitos: 16,4%	IFI - 4,8% (1:40)
<i>R. conorii</i>	—	—	<i>Rickettsia</i> spp.: 31,7% (1:64)	—	—	IFI - 55% (1:64) qPCR – 0%
Co-infecções	37,1%	—	25,6%	—	Saudáveis: 2,0% Suspeitos: 11,6%	—

Tabela 34: Prevalências de hemoparasitas em cães por estudos realizados por outros autores em diferentes países/locais (continuação).

<b>Autor</b>	<b>Pennisi <i>et al.</i>, 2012</b>	<b>Vargas-Hernández <i>et al.</i>, 2012</b>	<b>Kohn <i>et al.</i>, 2011</b>	<b>Silva, 2011</b>	<b>Figueiredo, 2008</b>	<b>Ferreira, 2008</b>
<b>Local</b>	Itália, Estreito de Messina	Colômbia	Alemanha, Berlim	Portugal, Setúbal	Portugal, Bragança	Portugal, Lisboa
<b>Método</b>	IFI	IFI e PCR	Esfregaço sanguíneo, IFI e PCR	IFI	Esfregaço sanguíneo, IFI e PCR	IFI
<b>População</b>	Cães de canis públicos e privados	Cães militares, de canil e com proprietário	Cães saudáveis e suspeitos de CAMV	Cães de canil	Cães de proprietário	Cães de CAMV
<b>Nº amostra</b>	249	91	522	80	473	28
<b>Prevalência global</b>	95%	—	—	58,75%	—	88,5%
<b><i>B. canis</i></b>	70% (1:20)	IFI ( <i>B. vogeli</i> ): 51,6%(1:40) PCR ( <i>Babesia</i> sp.): 5,4%	—	20% (1:20)	—	61%
<b><i>A. Phagocytophilum</i></b>	38% (1:80)	—	Esfregaço sanguíneo:2,3% IFI (1:64): 43,3% PCR: 5,7%	12,5% (1:50)	IFI (1:128): 17,6% PCR: 0%	—
<b><i>E. canis</i></b>	46% (1:50)	IFI – 82,4% (1:20) PCR – 40,6%	—	16,25% (1:40)	IFI (1:128): 14,8%	39%
<b><i>R. conorii</i></b>	72% (1:50)	—	—	23,75% (1:64)	IFI (1:128): 55,3%	87%
<b>Co-infecções</b>	61%	—	—	20%	—	



## Anexo VII: Estudos sobre parasitas intestinais em cães

Tabela 35: Prevalências de parasitas intestinais obtidos por estudos realizados por outros autores em diferentes países.

Autor	Al-Sabi <i>et al.</i> , 2013	Beiromvand <i>et al.</i> , 2013	Riggio <i>et al.</i> , 2013	Kimura <i>et al.</i> , 2013	Becker <i>et al.</i> , 2012
Local	Dinamarca, Zealand e Jutland	Irão	Itália, Central	Japão, Osaka	Alemanha, Norte
Método	Kit de flutuação comercial (Fecalyzer® EVSCO, USA).	Flutuação e Ziehl-Neelsen	Flutuação e Kit comercial (RIDAQUICK®Cryptosporidium /Giardia)	Sedimentação	Flutuação, Sedimentação e teste comercial (IDEXX SNAP® Giardia)
População	Cães de caça	Cães errantes e com proprietário	Cães com dono	Cães errantes	Cães errantes e cães adotados
Nº amostra	178	77	239	212	445
Prevalência global	21,3%	66%	31%	39,2%	9,4%
<i>Toxocara canis</i>	12,4 %	25%	13%	25,0%	4,0%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	—	—	0,8%	—	—
<i>Ancylostoma caninum</i>	—	Ancilostomídeos: 1%	2,0%	1,9%	Ancilostomídeos: 0,9%
<i>Uncinaria stenocephala</i>	7,3%	—	1,25%	—	—
<i>Trichuris vulpis</i>	—	6%	3,3%	8%	—
<i>Taenia</i> spp.	1,7%	18%	0,4%	2,4%	—
<i>Dipylidium caninum</i>	—	1%	1,25%	—	—
<i>Giardia</i> spp.	—	—	3,8%	—	11,4%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	—	5%	—	—	—

Tabela 35: Prevalências de parasitas intestinais obtidos por estudos realizados por outros autores em diferentes países (continuação).

<b>Autor</b>	<b>Xhaxhiu <i>et al.</i>, 2011</b>	<b>Ferreira <i>et al.</i>, 2011</b>	<b>Lebre, 2011</b>	<b>Savilla <i>et al.</i>, 2011</b>	<b>Klimpel <i>et al.</i>, 2010</b>	<b>Soriano <i>et al.</i>, 2010</b>
<b>Local</b>	Albânia, Tirana	Portugal, Évora	Portugal, Lisboa	USA, Virginia Oeste	Brasil, Fortaleza	Argentina, Neuquén
<b>Método</b>	Flutuação, Sedimentação e conteúdo de lavagem do Ap. Digestivo	<i>Faust</i> modificado	Flutuação e IFD	Flutuação	Necrópsia e Sedimentação	Flutuação, Sedimentação e Ziehl-Neelsen
<b>População</b>	Cães de áreas suburbanas	Cães e gatos de canil e de CAMV	Cães de canil	Cães de CAMV	Cães errantes	Cães (fezes colhidas no solo)
<b>Nº amostra</b>	111	148	124 e 34	231	46	1944
<b>Prevalência global</b>	99,1%	39,2%	23,4% e 61,8%	34,2%	82,6%	37,86%
<b><i>Toxocara canis</i></b>	75,5%	7,4 %	1,6%	6,9%	8,7%	16,35%
<b><i>Strongyloides stercoralis</i></b>	—	—	—	—	—	—
<b><i>Ancylostoma caninum</i></b>	13,5%	7,4%	Ancilostomídeos: 9,7%	23,4%	95,7%	0,41%
<b><i>Uncinaria stenocephala</i></b>	64,9%	—	—	—	—	—
<b><i>Trichuris vulpis</i></b>	21,6%	2,0%	1,6%	7,8%	4,3%	6,06%
<b><i>Taenia</i> spp.</b>	<i>T. hydatigena</i> : 16,2% <i>E. granulosus</i> : 2,7%	—	—	—	—	12,65%
<b><i>Dipylidium caninum</i></b>	65,8%	—	0,8%	—	45,7%	0,31%
<b><i>Giardia</i> spp.</b>	—	23,0%	55,9%	—	2,2%	1,29%
<b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b>	—	—	17,6%	—	—	—

Tabela 35: Prevalências de parasitas intestinais obtidos por estudos realizados por outros autores em diferentes países (continuação)

<b>Autor</b>	<b>Gracenea <i>et al.</i>, 2009</b>	<b>Silva, 2008</b>	<b>Martínez-Moreno <i>et al.</i>, 2007</b>	<b>Miró <i>et al.</i>, 2007</b>	<b>Dubná <i>et al.</i>, 2007</b>
<b>Local</b>	Espanha, Barcelona	Portugal, Norte	Espanha, Córdoba	Espanha, Madrid	República Checa, Praga
<b>Método</b>	Formol-Éter difásico e Ácido-rápido modificado	Flutuação, Sedimentação, McMaster, Ziehl-Neelsen, IFD	Flutuação, Esfregaço fecal e Necrópsia	Sedimentação	Flutuação e McMaster
<b>População</b>	Cães errantes	Cães na sua maioria de caça, pastores e errantes	Cães de canil	Cães de Canil	Fezes colhidas nas ruas e parques, maioritariamente provenientes de cães de proprietários
<b>Nº amostra</b>	505	39	1800	1161	3780
<b>Prevalência global</b>	26,9%	69,2%	71,4%	28%	17,6%
<b><i>Toxocara canis</i></b>	6,5%	10,3%	17,72%	7,8%	6,2%
<b><i>Strongyloides stercoralis</i></b>	—	25,6%	—	—	—
<b><i>Ancylostoma caninum</i></b>	4,3%	Ancilostomídeos: 53,8%	—	Ancilostomídeos: 4,0%	0,4%
<b><i>Uncinaria stenocephala</i></b>	—		33,27%		0,4%
<b><i>Trichuris vulpis</i></b>	5,3%		1,66%		1,1%
<b><i>Taenia</i> spp.</b>	—	2,6%	<i>T. hydatigena</i> : 7,66% <i>T. pisiformis</i> : 4,0%	2,9%	1,0%
<b><i>Dipylidium caninum</i></b>	—	—	13,2%	0,9%	0,4%
<b><i>Giardia</i> spp.</b>	6,1%	—	1,0%	7%	0,1%
<b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b>	6,3%	13,5%	—	—	1,4%